

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



MECANISMOS DE INACTIVAÇÃO DO GENE *LRP1B* EM TUMORES DA TIRÓIDE

JOANA ANTUNES TORRES

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR HUMANA

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



MECANISMOS DE INACTIVAÇÃO DO GENE *LRP1B* EM TUMORES DA TIRÓIDE

JOANA ANTUNES TORRES

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR HUMANA

2009

Dissertação de Mestrado orientada

pela Professora Doutora Paula Soares

Faculdade de Medicina - Universidade do Porto

Coordenadora do grupo Biologia do Cancro – IPATIMUP

&

pelo Professor Doutor Rui Gomes

Departamento de Biologia Vegetal

Faculdade de Ciências - Universidade de Lisboa.

O trabalho apresentado foi realizado no Grupo Biologia do Cancro
no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular
da Universidade do Porto (IPATIMUP)

RESUMO

Os tumores da tiróide são o tipo mais frequente de neoplasia endócrina e podem ocorrer na forma esporádica e familiar. O *LRP1B* é um potencial gene supressor de tumores cujo papel nunca foi investigado em tiróide. Os genes supressores de tumores podem ser inactivados por diversos mecanismos entre os quais mecanismos epigenéticos. A epigenética compreende um conjunto de mecanismos que regulam a expressão génica não envolvendo modificações na sequência nucleotídica. Os mecanismos epigenéticos envolvem metilação de DNA, modificações de histonas, RNAs não codificantes e posição do nucleossoma.

O objectivo deste trabalho foi investigar, a nível molecular e funcional, os mecanismos epigenéticos de inactivação do *LRP1B* em linhas celulares e tumores da tiróide.

Estudou-se o estado de metilação de um fragmento de 230pb da ilha CpG do *LRP1B* em 10 linhas celulares derivadas de carcinomas da tiróide e em tumores da tiróide (20 AFTs, 17 CFT, 24 CPT, 10 CAT e 12 CNMTF), por conversão de bissulfito seguido de sequenciação. Detectou-se metilação em 30% das linhas celulares e em 40% das lesões da tiróide. No entanto, nenhuma das tiróides normais estudadas revelou metilação da ilha CpG do *LRP1B*. Para avaliar a influência da metilação na expressão, realizaram-se tratamentos com agentes desmetilantes (5-Aza e siDNMT1). Observou-se re-expressão do *LRP1B* numa das linhas com metilação. Para investigar o papel da metilação de histonas, silenciou-se a HMT G9a (H3K9) através de siRNA, o que resultou na diminuição da expressão do *LRP1B* numa linha celular sem metilação de DNA.

Em conclusão, encontrámos metilação do promotor do *LRP1B* especificamente em tumores da tiróide. Salienta-se a sua ausência total em amostras de tiróides normais. Elucidámos, em linhas celulares, alguns dos mecanismos de inactivação do *LRP1B*. Os nossos resultados sugerem a metilação do promotor do *LRP1B* como um biomarcador epigenético com elevada especificidade e baixa sensibilidade.

Palavras-Chave: Neoplasias da tiróide, *LRP1B*, Epigenética, Metilação de DNA, Modificações de histonas.

ABSTRACT

Thyroid tumours are the most frequent type of endocrine neoplasia and can occur in both sporadic and familial forms. *LRP1B* is a potential tumour suppressor gene and its role has never been addressed in thyroid. Tumour suppressor genes can be inactivated by a number of different mechanisms, namely epigenetic events. Epigenetics refers to the mechanisms that regulate gene expression without modifying the underlying DNA sequence. Some epigenetic mechanisms should be highlighted such as DNA methylation, histone modifications, non coding RNAs and nucleosome position.

The aim of this work was to investigate the role of epigenetic events underlying *LRP1B* inactivation in both thyroid cell lines and tumours, using a molecular and functional approach.

A 230bp fragment of *LRP1B* CpG island was studied in 10 thyroid carcinoma-derived cell lines and 83 thyroid tumours (20 FTA, 17 FTC, 24 PTC, 10 ATC and 12 FNMTTC), using bisulfite conversion followed by sequencing. It was observed methylation in 30% of the cell lines and in 40% of the thyroid lesions. None of the normal thyroid samples revealed methylation in *LRP1B* CpG island. In order to evaluate the role of methylation in gene expression we performed a treatment with demethylating agents (5-Aza and siDNMT1). The treatment led to the reexpression in a cell line with DNA methylation. The role of histone methylation was assessed with the silencing of HMT G9a (H3K9) using siRNA leading to a decrease in *LRP1B* expression in one cell line without DNA methylation.

In summary, we found DNA methylation in *LRP1B* promoter region in the studied thyroid tumours. However we did not find any DNA methylation in normal thyroid samples. We clarified some of the *LRP1B* inactivating mechanisms in cell lines. Our results suggest *LRP1B* promotor DNA methylation as an epigenetic biomarker with high specificity and low sensibility.

Keywords: Thyroid Neoplasia, *LRP1B*, Epigenetics, DNA methylation, Histone modifications.

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial a todos aqueles que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho...

À Doutora Paula Soares, pela oportunidade de integrar o grupo *Cancer Biology*.

Ao Doutor Rui Gomes, por ter aceite ser meu orientador interno.

Ao Hugo Prazeres, pela criatividade científica, vivacidade, “alegria no trabalho”, empenho, disponibilidade e amizade. Espero ter estado à altura dos teus desafios diários, de ter conseguido acompanhar as tuas novas ideias (mais que muitas) e, acima de tudo, ter correspondido às tuas expectativas. Reconheço o mérito do teu trabalho, mas espero que todos o reconheçam. Gostei muito de trabalhar e aprender contigo. Obrigada pela tua orientação e confiança depositada neste trabalho.

Ao Professor Sobrinho-Simões, pelo entusiasmo contagiante pela ciência e preocupação pela integração dos “mais novos”.

Aos colegas do *Cancer Biology* pela simpatia com que me acolheram. Agradeço-vos a amizade que fiz com muitos de vós.

Aos meus amigos que, embora distantes, acompanharam mais uma etapa da minha vida. Mad, obrigada por poder contar sempre contigo.

À minha família..Avó, Ché, Tia Iria, Vasco, Susana, Toninho, Tózinho obrigada por me terem recebido e terem feito companhia em muitos fins-de-semana. À restante família, da qual especialmente me afastei, e que sempre me acompanhou em todas as ocasiões..Tataia e Tia Rosa obrigada por tudo! Um agradecimento super especial ao Mig por nunca se esquecer de mim, pelas suas demonstrações de afecto, preocupação e saudades.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional nas minhas decisões. Estou grata pelo incentivo que me deram, ao longo destes anos, a lutar por tentar fazer o que se gosta. Todas as palavras são poucas para expressar o meu agradecimento por alguns sacrifícios que fizeram para me proporcionarem a educação que resultou na pessoa que hoje sou.

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E CONVENÇÕES

A	Resíduo de nucleótido contendo a base de DNA Adenina
ac	Acetilação
AFT	Adenoma Folicular da Tiróide
AML	Leucemia mielóide aguda (do inglês, <i>Acute myeloid leukemia</i>)
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ATC	<i>Anaplastic Thyroid Carcinoma</i>
BRAF	Isoforma da treonina kinase RAF
C	Resíduo de nucleótido contendo a base de DNA Citosina
^m C	Citosina metilada
^{m5} C	5-metilcitosina
CAP	<i>CXXC affinity purification</i>
CARM1	<i>Coactivator-associated arginine methyltransferase 1</i>
CAT	Carcinoma Anaplásico da Tiróide
cDNA	DNA complementar do mRNA (do inglês, <i>complementary DNA</i>)
CFT	Carcinoma Folicular da Tiróide
CG	dinucleótidos Citosina-Guanina
ChIP	Imunoprecipitação da cromatina (do inglês, <i>Chromatin ImunoPrecipitation</i>)
CLL	Leucemia linfocítica crónica (do inglês, <i>Chronic lymphocytic leukemia</i>)
CNMTF	Carcinoma Não-Medular da Tiróide Familiar
CO ₂	Dióxido de Carbono
CpG	dinucleótidos Citosina-Guanina
CPDT	Carcinoma Pouco Diferenciado da Tiróide
CPT	Carcinoma Papilar da Tiróide
CPT-VC	Carcinoma Papilar da Tiróide-Variante Clássica
CPT-VF	Carcinoma Papilar da Tiróide-Variante Folicular
CTNNB1	Gene que codifica para a β-catenina
DEPC	<i>Diethyl pyrocarbonate</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Desoxyribonucleic acid</i>)
DNMT	Metiltransferase de DNA (do inglês, <i>DNA MetilTransferase</i>)
dNTP	Trifosfato de desoxinucleótido
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)</i>
FBS	Soro fetal bovino (do inglês, <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FNMTc	<i>Familial NonMedullary Thyroid Carcinoma</i>
FTA	<i>Follicular Thyroid Adenoma</i>
FTC	<i>Follicular Thyroid Carcinoma</i>
g	Grama
G	Resíduo de nucleótido contendo a base de DNA Guanina
G9a	ou EHMT2 (<i>Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2</i>)
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
H	Base A, T ou G
H3	Histona 3
HAT	AcetilTransferase de Histona

HDAC	DesAcetilase de Histona
HELP	<i>HpaII tiny enrichment by ligation-mediated PCR</i>
HDMT	DesMetilase de Histona (ou HDM)
HMT	MetilTransferase de Histona
H ₂ O	Água
HP1	Proteína 1 da heterocromatina (do inglês, <i>Heterochromatin Protein 1</i>)
huPO	<i>human acidic ribosomal protein</i>
K	Lisina
kb	kilopb (1000pb)
kDa	Unidade de massa correspon dente a 1000 unidades de massa atômica
L	Litro
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês, <i>Low-Density Lipoprotein</i>)
LRP	<i>LDL receptor-related protein</i>
LRP1B	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1B</i>
LRP-DIT	<i>LRP-Deleted In Tumours</i>
LDLR	Receptores de lipoproteínas de baixa densidade
LOH	Perda de heterozigotia (do inglês, <i>Loss Of Heterozygosity</i>)
M	Molar
MAP	<i>MBD affinity purification</i>
MBD	Domínios de ligação a grupos metil (do inglês, <i>Methyl Binding Domain</i>)
MBP	Proteínas de ligação a grupos metil (do inglês, <i>Methyl Binding Protein</i>)
me1	mono-metilação
me2	di-metilação
me3	tri-metilação
MedIP	Imunoprecipitação de DNA metilado (do inglês, <i>Methyl-DNA immunoprecipitation</i>)
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	mililitro
mM	milimolar
MMP	Metaloproteinase de matriz (do inglês, <i>Matrix MetalloProteinase</i>)
MNG	Bócio multinodular (do inglês, <i>Multinodular goiter</i>)
mRNA	RNA mensageiro
MSP	<i>Methylation Specific PCR</i>
ng	Nanograma
NH ₃ ⁺	Grupo amino
NMTC	<i>NonMedullary Thyroid Carcinoma</i>
NTRK1	<i>Neurotrophic Tyrosine Kinase receptor type 1</i> (ou TRK)
p	braço curto do cromossoma
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor type 1</i>
PAX8	<i>Paired box 8</i>
pb	Número de pares de resíduos de nucleótidos (do inglês, <i>base pairs</i>)
PCR	Reacção em cadeia catalisada pela enzima Taq polimerase (do inglês, <i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PenStrep	Penicilina-Estreptomicina
PPAR γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ</i>
PRKAR1A	<i>Type 1A regulatory subunit of protein kinase A</i>
PRMT4	<i>Protein arginine N-methyltransferase-4</i>
PRN	<i>Papillary Renal Neoplasia</i>

PTC	<i>Papillary Thyroid Carcinoma</i>
PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
q	braço longo do cromossoma
qPCR	PCR quantitativo
R	Arginina
RAF	<i>RApid growing Fibrosarcoma</i>
RAS	<i>RAt Sarcoma</i>
RET	<i>REarranged during Transfection</i>
RLGS	<i>Restriction Landmark Genomic Scanning</i>
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA de interferência (do inglês, <i>RNA interference</i>)
RPMI	Meio de cultura desenvolvido por <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rpms	Unidade da velocidade angular (nº rotações por minuto)
RT	Transcrição Reversa
RT-PCR	Reacção em cadeia catalisada pela polimerase após transcrição reversa (do inglês, <i>Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction</i>)
SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
SAM	S-adenosilmetionina
SETDB1	<i>SET domain, bifurcated 1</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SMD	Síndrome mielodisplásico (do inglês, <i>myelodysplastic syndrome</i>)
SNP	Polimorfismo de base única (do inglês, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
STR	Motivos que se repetem inúmeras vezes (do inglês, <i>Short Tandem Repeats</i>)
SUV39H1	<i>Suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila)</i>
T	Resíduo de nucleótido contendo a base de DNA Timina
T3	Hormona triiodotironina
T4	Hormona tiroxina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> - DNA polimerase da estirpe termofílica <i>Thermus aquaticus</i> (Taq DNA polimerase)
TCO	<i>Thyroid tumors with cell oxyphilia</i>
TSA	Tricostatina A
TSH	<i>Thyroid Stimulating Hormone</i>
U	Unidade de actividade enzimática
uPA	Activador do plasminogénio do tipo uroquinase (do inglês, <i>urokinase Plasminogen Activator</i>)
uPAR	Receptor uPA (do inglês, <i>uPA receptor</i>)
UTR	Região não traduzida (do inglês, <i>UnTranslated Region</i>)
UTX	<i>Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat</i>
W	Base A ou T
WNT	<i>Wingless int</i>
WRN	Gene responsável pelo <i>Werner Syndrome</i> , codifica uma DNA helicase
°C	Grau centígrado
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Mícron (micra, plural)
µM	Micramolar
5-AzaC	5-Azacitidina (5AC)
5-Aza-CdR	5-Aza-2'-desoxicitidina (DAC)

ÍNDICE

Resumo	iii
Abstract	iv
Agradecimentos	v
Abreviaturas	vi
Índice	ix
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiii
I.Introdução	1
1.1. Tipos histológicos do carcinoma da tiróide	1
1.1.1. Características moleculares do carcinoma da tiróide	2
1.1.2. Formas familiares do carcinoma da tiróide	2
1.2. Estrutura e função do LRP1B e o seu papel como Gene Supressor Tumoral	3
1.2.1. Mecanismos de inactivação de genes supressores de tumores	5
1.3. Mecanismos epigenéticos de regulação da expressão genética	5
1.3.1. Metilação de DNA	6
1.3.1.1. Metiltransferases de DNA (DNMTs)	7
1.3.1.2. Mecanismos de silenciamento genético associado à Metilação de DNA	8
1.3.2. O código de modificação de histonas	8
1.3.2.1. Metiltransferases e Desmetilases de Histonas	10
1.3.3. Relação entre Metilação de DNA e de Histonas	10
1.4. Aplicações Clínicas: biomarcadores e terapia epigenética	11
1.5. Objectivos	11
II. Materiais e Métodos	12
2.1. Cultura celular de linhas derivadas de carcinoma da tiróide	12
2.2. Tiróides Normais e Tumores Primários	12
2.3. Extracção de ácidos nucleicos (DNA e RNA)	13
2.4. Análise do estado de metilação da ilha CpG do LRP1B	14
2.4.1. Identificação, in silico, da ilha CpG do LRP1B	14
2.4.2. Conversão de Bissulfito	14
2.4.3. Amplificação de DNA convertido	14
2.4.4. Clonagem do fragmento amplificado por PCR	15
2.4.5. Sequenciação de DNA	15
2.5. Tratamento com 5-Aza-CdR e TSA	15

2.6. Transfecção de linhas celulares com siRNAs (siDNMTs, siHMTs)	15
2.7. RT-PCR quantitativo	16
III. Resultados e Discussão	17
3.1. Estado de metilação da ilha CpG do LRP1B em linhas células de carcinoma da tireóide	17
3.2. Relação funcional entre metilação da ilha CpG e expressão genética do LRP1B	18
3.2.1. Correlação entre o estado de metilação e os níveis de expressão de LRP1B	18
3.2.2. Efeito de agentes desmetilantes	19
3.2.2.1. 5-Aza-CdR	19
3.2.2.2. siDNMT1	21
3.3. Estado de metilação da ilha CpG do LRP1B em Tumores da tireóide	22
3.4. Papel da Metilação de Histonas na expressão do LRP1B	25
IV. Conclusões	28
V. Perspectivas Futuras	28
VI. Referências	29
Anexos	i

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Metilação de DNA em Linhas Celulares de carcinoma da tiróide.	17
Figura 2 – Representação da metilação em diferentes produtos de clonagem obtidos nas linhas XTC-1, KAT-4 e ARO.	18
Figura 3 – Expressão normalizada de <i>LRP1B</i> nas linhas celulares de carcinomas da tiróide (sonda X89-90). Correlação dos níveis de expressão com metilação do promotor.	19
Figura 4 – Confirmação do efeito da desmetilação na linha celular ARO.	19
Figura 5 – Tratamentos com 5-Aza e TSA.	20
Figura 6 – Expressão relativa do <i>LRP1B</i> nas linhas celulares XTC-1, KAT-4 e ARO, nas condições Si controlo e Si DNMT1.	21
Figura 7 – Resultados obtidos no estudo da metilação do promotor do <i>LRP1B</i> em Tiróide Normal (n=9), Tumores esporádicos (Adenomas (n=19), Carcinomas Foliculares (n=12), Carcinomas Papilares (n=11), Carcinomas Indiferenciados (n=6)) e Tumores Familiares (incluindo Normal Fam18/Noé; n=12).	22
Figura 8 – Cromatogramas exemplificativos de diferentes padrões de metilação.	23
Figura 9 – Representação de padrões de metilação nos casos CFT 11 e 13, obtidos após conversões de bissulfito e <i>Nested</i> PCR independentes.	23
Figura 10 – Cromatograma exemplificativo de metilação em locais não-CG.	24
Figura 11 – Expressão normalizada das metiltransferases SUV39H1, SETDB1, EZH2 e G9a nas diferentes linhas celulares de carcinomas da tiróide.	25
Figura 12 – Expressão relativa de <i>LRP1B</i> após silenciamento com siRNA para G9a.	26

Anexos

Figura 1A – Família LDLR.	i
Figura 2A – Modelo alusivo às funções diferenciais de LRP1 e LRP1B na endocitose e regeneração de uPAR.	i
Figura 3A – Contribuição da metilação para a inativação de genes supressores tumorais.	ii
Figura 4A – Mecanismos de regulação epigenética.	ii
Figura 5A – Alteração do padrão de metilação de DNA na progressão tumoral.	ii
Figura 6A – Mecanismos de repressão mediados pela mediação de DNA.	ii
Figura 7A – Representação das modificações pós-traducionais na cauda da histona H3.	iii

Figura 8A – Representação do promotor nos estados activo, inactivo transitório e inactivo permanente em função da posição do nucleossoma, modificações de histonas e metilação de DNA.	iii
Figura 9A – Regulação dinâmica da metilação de histonas por HMTs e HDMTs.	iii
Figura 10A – Representação de um promotor rico em CGs, activo e silenciado, com as respectivas modificações epigenéticas.	iii
Figura 11A – Mecanismos de inibição de DNMT1 pela 5-Aza.	v
Figura 12A – Ilha CpG do gene <i>LRP1B</i> .	vi
Figura 13A – Análise do estado de metilação.	vi

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência da metilação em linhas celulares, tiróides normais, tumores esporádicos e familiares. 23

Tabela 2 – Frequência das bases no fragmento 2. 24

Anexos

Tabela 1A – Alterações moleculares em carcinomas da tiróide. i

Tabela 2A – Métodos para análise de metilação de DNA e histonas. iv

Tabela 3A – Inibidores de DNMTs e HDACs em uso em ensaios terapêuticos. v

Tabela 4A – Sequências dos *primers* F (*Foward*) e R (*Reverse*) utilizados nas duas reacções de PCR, após conversão por bissulfito, tamanho do fragmento amplificado (pb), programa de PCR e número de ciclos. vi

Tabela 5A – Composição das reacções de PCR para um volume final de 25µL. vi

I. INTRODUÇÃO

1.1. Tipos histológicos de carcinoma da tiróide

A tiróide é uma glândula endócrina, localizada na região cervical, anterior à laringe. Sintetiza as hormonas tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), que controlam a taxa de metabolismo do organismo. Esta glândula é composta por folículos, formados por um epitélio simples, as células foliculares. Internamente, os folículos, contêm uma substância gelatinosa, designada por colóide, constituído por tireoglobulina. O principal mecanismo regulador do estado estrutural e funcional da tiróide é a hormona TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*) que estimula a produção de hormonas da tiróide. As próprias hormonas da tiróide inibem a síntese de TSH, estabelecendo-se assim um mecanismo de retro-regulação da quantidade de T3 e T4¹. Existe ainda na tiróide um outro tipo de célula endócrina, as células parafoliculares ou células C, que sintetiza a hormona calcitonina e que não será objecto deste trabalho.

Os tumores da tiróide são a neoplasia mais frequente do sistema endócrino, embora representem apenas 1% de todos os tumores humanos, com uma incidência anual estimada de 122000 novos casos, a nível mundial. A etiologia do cancro da tiróide tem sido associada a vários factores ambientais, que podem resultar em efeitos genotóxicos ou não-genotóxicos. A dependência da tiróide na absorção do iodo do ambiente, torna este órgão mais susceptível aos efeitos genotóxicos do iodo radioactivo, que induz danos no DNA. Por outro lado, a deficiência de iodo resulta em efeitos não-genotóxicos, relacionados com a estimulação por TSH. Na etiogénese do cancro da tiróide são também apontados factores genéticos e hormonais. Os carcinomas da tiróide são quatro vezes mais frequentes em indivíduos do sexo feminino, o que sugere o envolvimento de um receptor hormonal específico de género na patogénese destes tumores².

Os tumores da tiróide derivados das células foliculares podem ser benignos, como o Adenoma Folicular da Tiróide (AFT), ou malignos³. Estes últimos podem ser subdivididos em quatro tipos histológicos: Carcinoma Papilar, Carcinoma Folicular, Carcinoma Pouco Diferenciado e Carcinoma Anaplásico da Tiróide (CPT, CFT, CPDT e CAT, respectivamente). No CPT, as células neoplásicas apresentam características nucleares típicas: núcleo clarificado, volumoso, irregular, com pseudo-inclusões e fendas. São reconhecidas diferentes variantes do CPT, apresentando a variante clássica (CPT-VC) um padrão de crescimento formando papilas. A variante folicular (CPT-VF) é também bastante comum e nesta as células foliculares apresentam as características nucleares de CPT, contudo, o padrão de crescimento é semelhante ao da tiróide normal, com mais de 95% do tumor constituído por folículos⁴. Os CFTs têm um padrão de crescimento folicular, sendo distinguidos do AFT pela observação de invasão da cápsula e/ou invasão vascular. Acredita-se que a maioria dos CPDT e CAT resultam da desdiferenciação dos CPT e CFT.

Os carcinomas diferenciados representam 94% dos tumores malignos da tiróide^{4,5}. Os doentes com carcinomas bem diferenciados têm um prognóstico e uma taxa de sobrevivência muito mais favoráveis do que os indivíduos com carcinomas indiferenciados, que têm uma sobrevivência igual ou inferior a um ano⁴.

1.1.1. Características moleculares do carcinoma da tiróide

A classificação dos carcinomas derivados das células foliculares nos histotipos referidos, que é baseada na morfologia e agressividade clínica, tem vindo a ser consolidada por estudos moleculares. A identificação de alterações genéticas distintas para estes quatro grupos² tem dado particular relevância à relação entre genótipo e fenótipo³. De facto, eventos genéticos distintos são detectados nos tumores bem diferenciados CPT e CFT⁶. Mutações activadoras do oncogene *BRAF* são detectadas nos CPTs e ausentes nos CFTs⁴. Parece também existir uma correlação entre as diferentes mutações no *BRAF* e a variante histológica do CPT: *BRAF*^{V600E} é típica do CPT-VC e *BRAF*^{K601E} e a deleção *BRAF*^{TV599-600M} do CPT-VF^{3,7}. As mutações no *RAS* são mais frequentes no CFT e são raras no CPT, com excepção do CPT-VF. Isto sugere que esta variante pode constituir uma entidade intermédia entre os dois tipos histológicos⁴. É ainda de salientar a existência de lesões benignas, em particular AFTs, com mutações no *RAS* em cerca de 20% dos casos. A correlação genótipo/fenótipo verifica-se também ao nível dos rearranjos genéticos detectados no CPT e no CFT: os rearranjos *RET/PTC1*, *RET/PTC3* (este último associado com a exposição a radiação)⁴ e *NTRK1* são detectados no CPT³. O rearranjo *PAX8-PPAR γ* é mais frequente em CFTs⁴ embora se tenha demonstrado a sua ocorrência, quer em AFTs, quer no CPT-VF³. Estes rearranjos não são detectados em CPDT e CAT, sugerindo que os tumores que possuem estes rearranjos não evoluem para CAT³. As mutações no gene supressor de tumores *TP53* são um evento muito raro nos carcinomas diferenciados, embora frequente na progressão para CAT^{3,4} (Tabela 1A - Anexo).

1.1.2. Formas familiares do carcinoma da tiróide

A maioria dos cancros da tiróide com origem na célula folicular ocorre de forma esporádica. As formas familiares representam 3,5% a 6,2%⁸ dos tumores bem diferenciados (CPT e CFT) e designam-se por Carcinomas Não-Medulares da Tiróide Familiar (CNMTF)^{5,8-10}. O CNMTF pode ocorrer como um componente de diversos síndromas de cancro, tais como a Polipose Adenomatosa Familiar, síndrome de Cowden, síndrome de Werner e complexo de Carney^{5,8}, associados a mutações nos genes *APC*, *PTEN*, *WRN* e *PRKAR1A*, respectivamente^{8,9}. No entanto, é reconhecido um grupo de CNMTFs, caracterizado pela preponderância de CPT, com um padrão de transmissão autossómico dominante, penetrância incompleta e antecipação, do qual se desconhece ainda quais os factores de

susceptibilidade genética^{8,10}. Várias evidências epidemiológicas, clínicas e genéticas, sugerem o envolvimento de factores de susceptibilidade genética para o CNMTF:

a) Dados epidemiológicos mostram um risco relativo para desenvolvimento de CNMTF 8 a 10 vezes maior nos familiares em primeiro grau de doentes com cancro da tiróide^{4,9,11-16}.

b) Clinicamente, os CNMTFs constituem uma entidade distinta das formas esporádicas, com pior prognóstico. Em contraste com os casos esporádicos, os CNMTFs, dos quais a forma mais comum é o CPT familiar, são caracterizados por uma maior incidência de multifocalidade e maior taxa de recorrência, levando à adopção de um tratamento mais agressivo^{8,17,18}.

c) Geneticamente, apesar da dificuldade em identificar factores de susceptibilidade genética para o CNMTF, devido à falta de famílias numerosas e à presumível heterogeneidade genética e interacção com factores ambientais, foram identificadas várias regiões cromossómicas em ligação com o CNMTF: nos cromossomas 1q21 (*locus PRN1*), 2q21 (*locus NMTC1*), 19p13.2 (*locus TCO1*)^{5,8-10}, 14q31 (*locus MNG1*)^{8,9}, 8p23.1-p22¹⁹ e 8q24²⁰.

No seu conjunto, estes dados apontam para a existência de factores genéticos que conferem uma susceptibilidade forte para o desenvolvimento destes tumores. No entanto, até à data, estes ainda não foram completamente caracterizados, e o(s) gene(s) envolvido(s) continua(m) por descobrir.

1.2. Estrutura e função do *LRP1B* e o seu papel como Gene Supressor Tumoral

O gene *LRP1B* (*low density lipoprotein receptor-related protein 1B*), inicialmente designado por *LRP-DIT* (*LRP-Deleted In Tumours*), codifica um membro da família de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR)²¹ e é um potencial gene supressor de tumores^{21,22}. Encontra-se inactivado por alterações genéticas e transcripcionais em aproximadamente 50% das linhas celulares de cancro do pulmão²³. Este gene localiza-se no cromossoma 2q21.2²², contido num dos *locus* de susceptibilidade para o CNMTF⁸. É constituído por 91 exões (500kb), a sequência do transcrito possui 16,5kb²², e é sintetizado como um precursor de 600kDa, que matura após modificação pós-traducional. Esta modificação consiste na clivagem proteolítica, pela endopeptidase furina, e resulta num heterodímero composto pelo domínio extracelular (515kDa), associado não covalentemente ao domínio transmembranar e intracelular (85kDa)^{21,22,24}.

Os membros da família LDLR partilham cinco unidades estruturais: (1) repetições ricas em cisteínas (domínio de ligação do ligando), (2) repetições similares a EGF (*epidermal growth factor*), (3) domínios YWTD em estrutura hélice- β , (4) um único segmento transmembranar e (5) cauda citoplasmática contendo motivos NPxY (endocitose e transdução de sinal) (Fig.1A(a) - Anexo)^{25,26}. Alguns membros da família LDLR são do tipo

LRP (ou seja, *lipoprotein receptor-related protein*), existindo uma elevada similaridade entre os membros *LRP1* (também designado *LRP*) e *LRP1B*^{22,27}. Os receptores *LRP1* e *LRP1B* diferem, contudo, no padrão de expressão (*LRP1* – fígado, cérebro e pulmão; *LRP1B* – cérebro, tiróide e glândulas salivares)²⁷. Nas proteínas *LRP1* e *LRP1B*, as repetições do tipo de ligação ao ligando ocorrem em *clusters* (I-IV) que contêm, respectivamente, 2, 8, 10 e 11 repetições (12 repetições no caso do *LRP1B*)^{25,27}. Na Figura 1A(b) estão representados os diferentes *clusters* e os respectivos ligandos para *LRP1*, não sendo conhecidos quaisquer ligandos para o *cluster* I²⁵.

Os LRPs estão implicados em dois grandes processos fisiológicos: endocitose e transdução de sinal, ao contrário do receptor de LDL (*LDLR*), cujo papel fisiológico é somente metabolismo de lipoproteínas. A particularidade de reconhecerem substratos não-lipídicos, permite-lhes participar, não apenas no metabolismo dos lípidos, como também na homeostase de proteinases, inibidores de proteinase, na entrada celular de toxinas, activação de enzimas lisossomais, transdução de sinal e neurotransmissão^{25,26}. As semelhanças estruturais entre *LRP1* e *LRP1B* fazem com que muitos dos ligandos identificados para o *LRP1* tenham sido confirmados como ligandos para o *LRP1B*, nomeadamente, diversos componentes do sistema de activação do plasminogénio^{21,27,28}. O sistema de activação do plasminogénio apresenta um importante papel em processos fisiológicos que requerem a degradação da membrana basal e remodelação da matriz extracelular^{28,29}. A activação do plasminogénio inicia-se com a acção de uPA (*urokinase Plasminogen Activator*) como catalizador na formação de plasmina a partir do seu precursor inactivo, o plasminogénio. A actividade de uPA é regulada por uPAR (*uPA receptor*) e PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor type 1*). A ligação de uPA a uPAR não resulta na internalização, permanecendo o complexo à superfície da célula. No entanto, quando uPA-uPAR se complexa com o inibidor (PAI-1), ocorre internalização e degradação do complexo. Esta internalização é da responsabilidade de *LRP1* (Fig.2A(a)). Foi demonstrado que o *LRP1B*, embora possua capacidade para formar complexos com uPA:PAI-1:uPAR, possui uma taxa de endocitose mais lenta que *LRP1*, o que conduz à acumulação dos complexos uPA:PAI-1:uPAR:*LRP1B* na superfície da célula. Isto faz com que não seja regenerado uPAR funcional. *LRP1B* funciona assim como regulador negativo da regeneração uPAR e, consequente, activação do plasminogénio (Fig.2A(b)). Deste modo, a inactivação de *LRP1B* e a activação de *LRP1* parecem estar correlacionados com a activação da cascata de plasminogénio e com o aumento da invasão e metastização das células tumorais²⁸. Recentemente foi descrito outro processo pelo qual *LRP1* promove a invasão e migração celulares. Verificou-se, em glioblastoma, que o *LRP1* induz a expressão e função de proteinases da matriz extracelular, nomeadamente metaloproteinases 2 e 9³⁰. Não foi contudo investigado o papel do *LRP1B* na activação de MMPs. Para além do papel dos

LRPs na endocitose, foi também descrita a sua importância nas funções de sinalização. A este respeito, interessa realçar as funções intracelulares de membros da família LRP, nomeadamente as funções de LRP5/LRP6 como co-receptores na via de sinalização WNT. Foi também demonstrado que o LRP1 inibe esta via³¹. O papel do LRP1B nos mecanismos de transdução de sinal não está ainda estabelecido.

O *LRP1B* tem vindo a ser estudado em diferentes tipos de cancro. Como anteriormente referido, este gene foi inicialmente proposto como um supressor de tumores, devido à identificação de deleções homozigóticas em linhas celulares de cancro de pulmão. Foram também detectadas mutações pontuais e transcritos alternativos²³. Outros estudos mostraram que o *LRP1B* é inativado, por mecanismos genéticos ou epigenéticos, em diferentes linhas celulares e tipos de tumores, tais como leucemia^{32,33}, cancro do esófago³⁴, hepatocelular³⁵ e oral³⁶.

1.2.1. Mecanismos de inactivação de genes supressores de tumores

O cancro caracteriza-se pela ocorrência de alterações dinâmicas no genoma que conferem às células neoplásicas vantagem selectiva, pela aquisição de determinadas capacidades, tais como: autosuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais de inibição da divisão celular, evasão à apoptose, potencial replicativo ilimitado, promoção de angiogénese, invasão e metástase. Nesta conversão progressiva de células normais em células tumorais, verificam-se sucessivas mutações, que conduzem ao ganho de função de oncogenes e a perda de função de genes supressores de tumores³⁷.

Segundo a Hipótese dos “dois hits” de Knudson, baseada no modelo do Retinoblastoma hereditário, a inactivação dos genes supressores de tumores resulta de um primeiro evento mutacional (*first hit*) na linha germinativa, seguido de um segundo evento de inactivação (p.ex., deleção) na cópia normal correspondente (*second hit*), na linha somática³⁸. Existem pelo menos 3 possíveis tipos de “*hits* (=eventos)” que podem participar em diferentes combinações para causar a inactivação de gene supressor de tumor: mutações na região codificante, perdas (totais ou parciais) de cópias de genes ou silenciamento epigenético (Fig.3A). No modelo clássico de progressão tumoral (Modelo de Vogelstein), uma série de alterações genéticas conduzem a progressão dos estados pré-malignos à doença maligna. Nesta série de eventos crucial para o desenvolvimento tumoral, incluem-se as modificações epigenéticas, ocorrendo assim uma interacção entre as alterações genéticas e epigenéticas³⁹.

1.3. Mecanismos epigenéticos de regulação da expressão genética

A Epigenética pode ser definida como o conjunto dos factores que regulam a expressão genética que não envolvem modificações na sequência nucleotídica do DNA⁴⁰⁻⁴².

O genoma dos mamíferos está organizado na cromatina, uma estrutura complexa e compacta de DNA e proteínas, que pode adoptar diferentes conformações tridimensionais, dependendo do contexto nuclear e das modificações bioquímicas presentes nestes elementos. A cromatina possui dois estados: eucromatina, transcritionalmente competente e heterocromatina, transcritionalmente silenciada, podendo, em determinadas regiões genómicas, ocorrer transições entre estes dois estados⁴¹. A unidade básica constituinte da cromatina é o nucleossoma, composto por 146pb de DNA envolto em torno de um octâmero de histonas (um dímero de cada H2A, H2B, H3 e H4)⁴³⁻⁴⁵. Os mecanismos epigenéticos incluem metilação de DNA, modificações de histonas, posicionamento das variantes de histonas, remodelação do nucleossoma e RNAs não codificantes (Fig.4A(a)). Estes mecanismos interagem com factores de transcrição e outras proteínas de ligação ao DNA, com o intuito de regular os padrões de expressão génica, herdados de célula para célula. A metilação de DNA e as modificações covalentes das caudas de histonas contribuem, de forma informativa, para a maquinaria de posicionamento do nucleossoma (Fig.4A(b)) e, consequentemente, regula a acessibilidade da sequência dos genes à maquinaria de transcrição⁴⁶.

1.3.1. Metilação de DNA

A metilação de DNA está presente nos genomas de diversos organismos, incluindo procariotas e eucariotas. Nos primeiros a metilação de DNA ocorre nas bases citosina e adenina, enquanto nos organismos eucariotas, esta parece estar confinada à base citosina⁴⁷. O mecanismo bioquímico pelo qual ocorre a metilação de DNA consiste na adição covalente de um grupo metil ao carbono-5 do anel da citosina. A base resultante, 5-metilcitosina, está presente em aproximadamente 4% do DNA genómico em mamíferos⁴². Em DNA de mamíferos, a sequência alvo de metilação primária é a sequência dinucleotídica citosina-guanina (CpG). No entanto, menos de 80% destes possíveis locais de metilação são metilados⁴⁸. A maioria dos locais CpG surgem em baixa frequência ao longo do genoma, no entanto são mais frequentes em regiões específicas do DNA, designadas de ilhas CpG. As ilhas CpG correspondem a regiões de ~200pb nas quais existe mais de 50% de C e G, e em que a % observada de dupletos CpG é 60% superior à esperada⁴⁹. Estas ilhas estão tipicamente localizadas em regiões promotoras (extremidade 5' do gene – região não-traduzida do promotor e exão 1⁵⁰), onde é iniciada a transcrição génica⁴². O padrão de metilação de DNA no genoma de mamíferos é bimodal, isto é, a maioria dos dinucleótidos CpG encontram-se metilados, excepto aqueles localizados em regiões promotoras (ilhas CpG)⁵¹. Os diferentes locais CpG são metilados de forma distinta nos diferentes tecidos, criando um padrão de metilação específica do gene e do tecido⁴⁸. As modificações epigenéticas sofrem alterações com o aumento da idade, podendo mesmo resultar em

diferenças no fenótipo e na susceptibilidade para doenças em gémeos monozigóticos, que partilham o mesmo genótipo. Gémeos monozigóticos mostraram ser indistinguíveis epigeneticamente durante os primeiros anos de vida embora com o aumento de idade se observem diferenças notáveis no seu epigenoma, o que se correlaciona com uma expressão génica desigual⁵².

Apesar de em células de mamíferos, os locais de metilação de DNA serem predominantemente num contexto de dinucleótidos ^mCpG⁵³, está descrita a ocorrência de metilação em locais não-CpG, em plantas e fungos. Em vírus, foi descrita a metilação em citosinas num contexto de dinucleótidos CW e CWG (W=A ou T). Em células de linfomas, demonstrou-se a ocorrência de metilação em locais simétricos não-CG da subclasse CWG, nomeadamente em C^mCWGG, que foi associada à repressão da actividade transcricional *in vitro*⁵⁴. Está ainda por esclarecer noutros modelos celulares a especificidade desta metilação em locais não-CpG, assim como a sua frequência, distribuição e significado funcional^{53,54}. *In silico*, verificou-se que a localização destes locais CCWGG não ocorre no mesmo local que a metilação em CG (região 5' regulatória do gene), isto é, ocorre preferencialmente na sequência flanqueadora do gene⁵⁵.

O padrão de distribuição de 5-metilcitosina no DNA humano é distinto entre células normais e tumorais (Fig.5A). Existem pelo menos três formas pelas quais a metilação de CpG contribui para o fenótipo oncogénico: hipometilação global do genoma tumoral, hipermetilação focal de promotores de genes supressores de tumor, e mutagenese directa³⁹. Este último mecanismo deve-se à capacidade mutagénica da 5-metilcitosina, resultante do aumento da taxa de desaminação hidrolítica espontânea de bases na cadeia-dupla de DNA. Tal conduz a transições Citosina→Timina^{39,56}. Os mecanismos de reparação de DNA são subsequentemente menos eficientes na reparação de *mismatches* induzidos por desaminação. A hipometilação de DNA, que ocorre no genoma tumoral, afecta a estabilidade cromossómica e foi associada a um aumento da aneuploidia³⁹. Em contraste, a hipermetilação de regiões promotoras, pode resultar no silenciamento de genes que outra forma poderiam suprimir a tumorigénese⁴², e confere vantagem selectiva às células neoplásicas, tal como as mutações⁵⁶.

1.3.1.1. Metiltransferases de DNA (DNMTs)

A metilação de DNA é catalisada por metiltransferases de DNA (DNMTs)^{42,57}. A reacção de metilação ocorre imediatamente após a replicação, pela transferência de um grupo metil do dador SAM (S-adenosilmetionina) para o resíduo citosina⁴⁸. Em mamíferos, as DNMTs subdividem-se em duas classes: metiltransferases de novo, DNMT3a e DNMT3b, e metiltransferase de manutenção, DNMT1^{47,57}. As metiltransferases de novo possuem a capacidade de metilar C a ^{m5}C após replicação de DNA não metilado. A metiltransferase de

manutenção (DNMT1) adiciona preferencialmente o grupo metil a DNA hemimetilado durante a replicação⁵⁷. É através da capacidade da DNMT1 de reconhecer resíduos de CpG hemimetilados e metilar a cadeia oposta, que é possível reproduzir uma cópia do padrão de metilação presente na célula parental⁵¹.

A metilação de novo pode ocorrer por diversos mecanismos: as DNMT3 reconhecem o DNA ou cromatina através de domínios específicos, ou são recrutadas através de interações proteína-proteína com factores repressores da transcrição. Também o sistema de interferência mediado por RNA (RNAi) pode induzir a metilação de novo em sequências de DNA específicas⁴⁷. A expressão da metiltransferase DNMT3a é ubíqua, sendo a DNMT3b expressa em níveis baixos na maioria dos tecidos, apresentando elevados níveis de expressão nos testículos, tiróide e medula óssea. A DNMT3a metila preferencialmente locais flanqueados por pirimidinas, com elevada especificidade para metilar locais CpG, embora possua capacidade de metilar citosinas em dinucleótidos CW. A DNMT3b é especializada na metilação em CpG em sequências repetitivas de regiões pericêntricas dos cromossomas⁵⁷.

1.3.1.2. Mecanismos de silenciamento genético associado à Metilação de DNA

A metilação de DNA está correlacionada com o silenciamento da transcrição genética. Foram descritos pelo menos 4 mecanismos para este efeito: (a) a metilação de DNA pode reprimir directamente a transcrição, através do bloqueio do acesso de factores activadores da transcrição, (b) Indirectamente, através de MBPs (*methyl-binding proteins*) que reconhecem o DNA metilado e recrutam co-repressores que silenciam a expressão genética, (c) as próprias DNMTs que, para além da sua actividade catalítica, podem reprimir a iniciação da transcrição, (d) a metilação de DNA pode comprometer a fase de alongação da transcrição pois a metilação ao longo do gene pode resultar numa redução da acessibilidade da cromatina e numa redução da ocupação pela RNA polimerase (Fig.6A)⁴⁷.

O silenciamento mediado por DNMTs parece estar associado com a modificação da cromatina, através da interacção bioquímica com metiltransferases e desacetilases das histonas (HMTs e HDACs, respectivamente)⁴⁷.

1.3.2. O código de modificação de histonas

A região N-terminal das histonas é alvo de diversas modificações pós-traducionais. A Histona com maior número de aminoácidos sujeitos a modificação é a Histona H3⁴⁵. Estas modificações incluem acetilação (nos resíduos de Lisina 9, 14, 18, 56), fosforilação (Serina 10, 28 e Treonina 3 e 11), metilação (Lisinas 4, 9, 27, 36, 79 e Argininas 2, 8, 17, 26), ubiquitinação e sumoilação (Fig.7A)^{39,45}. Estas modificações, que podem ocorrer em diferentes combinações, alteram as propriedades electrostáticas e bioquímicas das histonas,

e reflectem-se em diferenças na interacção DNA/Histonas, que afectam a arquitectura da cromatina e a actividade transcricional⁴³. Há modificações que estão associadas com a repressão da transcrição, tais como a metilação da Lisina 9 e 27, enquanto outras estão associadas com activação da transcrição, como é o exemplo da metilação da Lisina 4, dando origem aos conceitos de “marcas” repressoras e “marcas” activadoras, de “cromatina bivalente” e de “código de histonas”^{39,45}. Por exemplo, a acetilação, que ocorre apenas em resíduos de lisina, consiste na adição de um grupo acetil ao grupo NH_3^+ , que confere carga positiva a este aminoácido. A acetilação deste grupo resulta na neutralização da carga positiva, diminuindo a intensidade da interacção electrostática com o DNA, que tem carga negativa, e traduz-se numa cromatina menos “empacotada” e transcricionalmente mais activa⁵⁸. Por este motivo, a acetilação corresponde a uma “marca” activadora. A hipoacetilação de histonas encontra-se em regiões heterocromáticas, enquanto a hiperacetilação se encontra na eucromatina. Os níveis desta acetilação resultam do equilíbrio entre a actividade local de AcetilTransferases e DesAcetilases de Histonas (HATs e HDACs, respectivamente)⁵⁹.

O “código de histonas” (o perfil de modificação de histonas) determina que diferentes combinações de histonas/nucleossomas apresentem resultados distintos relativamente à expressão genética. Existem quatro combinações de modificações de histonas, baseadas na classificação dos padrões dos níveis de expressão: (i) e (ii) níveis de expressão reduzidos associados com H3K27me3 e ausência de acetilação, ou associados apenas com H3K4me3, respectivamente, (iii), níveis intermédios, associados com H3K36me3 ou H4K16ac, e (iv) níveis elevados, associados com H4K16ac, H4K29me1, H3K79me1/2/3 e H2BK5me1. A modificação epigenética mais frequente da Histona H3 nas regiões promotoras, que ocorre imediatamente antes do local de iniciação da transcrição, consiste na remoção de um nucleossoma e a marca H3K4me3 (Fig.8A). Os genes inactivos distinguem-se das regiões não-codificantes e dos genes activos por um particular enriquecimento em H3K27. O silenciamento permanente está associado a metilação da H3K9 e metilação do DNA. As marcas repressoras H3K9me2/3, H3K27me3 e H4K29me3 estão associadas com heterocromatina e silenciamento génico. A comparação das marcas repressoras entre regiões não codificantes e codificantes sugere a existência de estruturas da cromatina associadas com diferentes modos de silenciamento (Fig.8A)⁴⁴.

Algumas das modificações são dinâmicas e reversíveis, tais como a fosforilação e a acetilação, enquanto a metilação parece ser uma modificação mais estável e envolvida no estabelecimento de uma memória celular do estado de transcrição, sendo a subsequente organização da cromatina mantida ao longo das divisões celulares⁴⁵.

Da mesma forma que existem padrões de metilação de DNA específicos para cada tipo de tecido, responsáveis pelo estabelecimento de um padrão de expressão genética

distinto, também o “código de histonas” é característico de cada tipo de tecido. Este perfil é “memorizado” e re-estabelecido aquando dos processos de re-estruturação da cadeia de DNA (tais como a replicação e a reparação de DNA) re-estabelecendo os “estados epigenéticos”³⁹. O padrão de metilação de DNA poderá ser um dos mecanismos usados para reconstrução do estado epigenético, a cada divisão celular⁵¹. Embora as modificações de histonas definam padrões de expressão génica herdadas da célula mãe para a célula filha, a hipótese destas modificações funcionarem como marcas epigenéticas hereditárias é ainda controversa⁴⁴.

1.3.2.1. Metiltransferases e Desmetilases de Histonas

A metilação de histonas pode ocorrer em resíduos de Lisina (K) e Arginina (R), pela actuação das MetilTransferases de Histonas (HMTs). Os resíduos de Lisina podem ser mono-, di- ou trimetilados (me1, me2 e me3, respectivamente), estando os diferentes graus de metilação associados com um efeito distinto na estrutura da cromatina e transcrição^{43,59}. Este tipo de modificação é uma marca estável⁵⁹, embora, de forma análoga à acetilação, seja regulada pelo balanço entre a actividade topográfica de HMTs e Desmetilases de histonas (HDMs) - que medeiam a remoção dos grupos metil (Fig.9A). É também de notar que a metilação de resíduos específicos de Lisina tem efeitos distintos: activação (H3K4) ou repressão transcricional (H3K79 e H4K27) (Fig.9A)⁴³.

Mutações ou sobre-expressão de algumas desmetilases têm sido associadas com cancro⁴³. Recentemente, foi descrito que um gene que codifica uma desmetilase de histonas (*UTX*), se encontra frequentemente mutado em vários tipos de cancro humano⁶⁰.

1.3.2. Relação entre Metilação de DNA e de Histonas

A interligação entre a metilação de DNA e modificações de histonas parece ocorrer em ambos os sentidos: (1) a metilação de histonas auxilia a definição dos padrões de metilação de DNA e (2) a metilação de DNA serve como molde para algumas modificações de histonas, após a replicação de DNA (Fig.10A)⁵¹.

(1) A metilação em H3K9 é um pré-requisito para a metilação de DNA⁴⁵, embora a metilação de DNA não seja dependente da metilação de histonas *per se*⁵¹. A metilação em H3K9 é reconhecida pela proteína HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) que, por sua vez, recruta DNMTs, através de interacções proteína-proteína, que procedem à metilação do DNA. A este respeito, foi demonstrado que as HMTs específicas de H3K9 associam-se fisicamente com a DNMT3a⁴⁵.

(2) O DNA metilado é reconhecido por uma família de proteínas, com domínios de ligação a grupos metil (MBD). As MBPs (*Methyl Binding Proteins*), recrutam HMTs que subsequentemente metilam a H3K9 e reprimem a transcrição génica⁵⁹.

Na Tabela 2A estão resumidas algumas das técnicas que podem ser utilizadas para estudo da metilação do DNA e Histonas.

1.4. Aplicações Clínicas: biomarcadores e terapia epigenética

A importância das modificações descritas, quer ao nível do DNA, quer ao nível de histonas, num contexto de genes relacionados com cancro, indica que a epigenética pode fornecer novos biomarcadores e novos alvos terapêuticos³⁹. Embora as alterações epigenéticas sejam hereditárias em células somáticas, estas podem ser revertidas pelo tratamento com fármacos⁴⁶. A “Terapia Epigenética” consiste na utilização de fármacos, ou conjugações de fármacos, que modifiquem os padrões de metilação de DNA e o estado da cromatina³⁹.

O cancro foi a primeira doença para a qual a desmetilação do DNA foi proposta como objectivo terapêutico⁴⁸. O agente desmetilante 5-azacitidina (5-azaC ou 5AC) e o seu derivado desoxi (5-azaCdR ou DAC; decitabine), sintetizados pela primeira vez em 1964⁶¹, são eficientes inibidores da metilação de DNA (Fig.11A(a))⁴². O tratamento de células em cultura com 5-azacitidina resulta na sua incorporação no DNA, em substituição dos resíduos de Citidina. Devido à substituição do carbono na posição 5 por um azoto, a DNMT1 fica bloqueada na cadeia de DNA que sofreu a substituição, resultando assim na sua inactivação. Consequentemente, a metilação de manutenção é inibida e, com a replicação de DNA, é sintetizado DNA de novo, contendo resíduos de citosina não-metilados. Desta forma, a desmetilação induzida pela 5-Aza, conduz ao re-estabelecimento da expressão de genes anteriormente silenciados por metilação no DNA (Fig.11A(b))⁴². Outros fármacos epigenéticos têm vindo a ser sintetizados e utilizados em ensaios clínicos, tais como inibidores de DNMTs e inibidores de HDACs (Tabela 3A)^{39,62-64}. A inibição de HMTs só agora começa a ser equacionada, não existindo, até à data, qualquer inibidor disponível.

Outro desafio promissor é a pesquisa de biomarcadores epigenéticos para diagnóstico precoce e avaliação do prognóstico do cancro. É de salientar que os biomarcadores epigenéticos apresentam vantagens relativamente a outros biomarcadores moleculares, em particular comparativamente a marcadores de expressão (mRNA ou proteína) pela maior estabilidade, natureza qualitativa e especificidade do tipo de tumor⁶².

1.5. Objectivos

Estudos prévios deste grupo de investigação, identificaram o *LRP1B* como um possível gene de susceptibilidade para CNMTF. O estado deste gene supressor de tumor nunca foi estudado em carcinomas da tiróide, quer familiares quer esporádicos, sendo portanto relevante o estudo dos mecanismos genéticos e epigenéticos subjacentes à sua

inactivação. O objectivo geral deste trabalho foi investigar, a nível molecular e a nível funcional, os mecanismos epigenéticos de inactivação do *LRP1B* em tumores da tiróide.

Os objectivos específicos deste trabalho foram:

- (1) analisar o estado de metilação da ilha CpG do *LRP1B* em linhas celulares de carcinomas da tiróide;
- (2) correlacionar directamente o estado de metilação com a expressão endógena do *LRP1B* em linhas celulares;
- (3) investigar a relação funcional entre metilação e expressão genética do *LRP1B*, através da utilização de agentes desmetilantes (5-Aza e siDNMT1);
- (4) avaliar a frequência e o padrão de metilação da ilha CpG do *LRP1B* numa série de tumores da tiróide e amostras de tecido normal da tiróide;
- (5) averiguar o papel da metilação de histonas na regulação da expressão do *LRP1B* em linhas com e sem metilação de DNA na ilha CpG.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultura celular de linhas derivadas de carcinoma da tiróide

Procedeu-se à cultura de 10 linhas celulares derivadas de cancro da tiróide, uma linha celular derivada de CFT – XTC-1; quatro derivadas de CPT – K1, B-CPAP, TPC1, NPA; cinco derivadas de CAT - Hth74, C643, 8505C, KAT-4, ARO. Durante a realização deste trabalho, Schweppe *et al*, pela análise de STR (*short tandem repeats*) e SNP (*single nucleotide polymorphism*), sugeriram que as linhas celulares ARO e KAT-4 podem derivar da linha celular HT-29 de cancro de cólon. Também sugerem que a linha celular NPA deriva da linha celular M14/MDA-MB-435S de melanoma⁶⁵.

As linhas celulares foram mantidas em meio RPMI-1640 (GIBCO) suplementado com 10% FBS (*fetal bovine serum*) (GIBCO), 1% Penicilina-Estreptomicina (PenStrep) (10000mg/mL-Pen e 10000µg/mL-Strep, GIBCO) e 0,5% Fungizona (250ng/µL, GIBCO). As células foram cultivadas em monocamada aderente e mantidas numa estufa de incubação a 37°C com 5% CO₂.

2.2. Tiróides normais e Tumores primários

Foram utilizadas 10 amostras de tiróide normal, obtidas de tireoidectomias realizadas a doentes operados a lesões da tiróide. As amostras foram colhidas no lobo contralateral àquele em que foi observado o nódulo tumoral. Foram também analisados tumores, fixados em formol e embebidos em parafina, que consistiram de 20 AFTs, 17 CFT, 24 CPT, 10 CAT e 12 CNMTFs.

2.3. Extração de ácidos nucleicos (DNA e RNA)

Para extração de DNA de linhas celulares adicionou-se 5mL de tampão de lise celular (*Cell Lysis Solution*, Citogene) a um T75. Nos tecidos fixados em formol e embebidos em parafina foram feitos quatro cortes de 10 μ m (micrótomo), seguidos de micro-dissecção manual do tecido tumoral. As amostras de tecido foram digeridas em 500 μ L de tampão de lise (*Cell Lysis Solution*, Citogene). Adicionou-se 1/20 volume de Proteinase K (20 μ g/ μ L), seguido de incubação a 55°C com agitação (durante a noite). Após a digestão as amostras foram centrifugadas a 14000rpms (5', 24°C), e guardou-se o sobrenadante. Tanto em linhas celulares como nos tecidos embebidos em parafina procedeu-se à extração de DNA pelo método de Phenol:Clorofórmio. Um volume de fenol-clorofórmio foi adicionado aos sobrenadantes, seguindo-se uma agitação vigorosa e centrifugação (14000rpms, 5', 24°C); retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 1volume de clorofórmio, seguido de agitação e centrifugação (14000rpms, 5', 24°C). Ao sobrenadante adicionou-se 1/10 volume de NaOAc (3M, pH=5,2) e 2-3 volumes de etanol 100% frio, seguido de incubação a -80°C (30'). Centrifugou-se 45min a 14000rpms (4°C), descartou-se o sobrenadante, seguido da adição de 1volume de etanol a 70% (frio) e centrifugação (14000rpms, 30', 4°C). Descartou-se o sobrenadante, a amostra secou à temperatura ambiente, sendo posteriormente dissolvida em H₂O (20 μ L).

Para obtenção de RNA de linhas celulares, utilizou-se o Método de Trizol (GIBCO). Adicionou-se 1mL de Trizol/poço e transferiu-se para um *eppendorf*, ao qual se adicionou 200 μ L de clorofórmio, seguido de agitação vigorosa e centrifugação para separação das fases. Removeu-se a fase aquosa para um novo *eppendorf* e procedeu-se à precipitação do RNA pela adição de 500 μ L de isopropanol, seguido de centrifugação. Lavou-se o *pellet* com etanol a 70% (500 μ L). Centrifugou-se e secou-se o *pellet* à temperatura ambiente. Dissolveu-se o *pellet* em H₂O DEPC (inibidor de RNases).

Para a extração de ácidos nucleicos de Tireóide Normais congeladas foi necessário homogenizar os tecidos frescos pelo uso de um Homogenizador Politron. Nestes tecidos procedeu-se à extração de RNA e DNA da mesma amostra (protocolo do Trizol). Após a extração de RNA da fase aquosa superior, foi adicionado 300 μ L de Etanol absoluto à fase inferior, o que resulta na precipitação do DNA. Após centrifugação, e subsequente sedimentação do DNA, removeu-se o sobrenadante phenol-etanol. O *pellet* de DNA foi lavado pela adição de 1mL de uma solução de 0,1M citrato de sódio em 10% de etanol, seguido de incubação (30', temp. ambiente) e centrifugação. Após duas lavagens, procedeu-se à suspensão do *pellet* de DNA em etanol (70%), centrifugou-se e descartou-se o sobrenadante. O *pellet* secou à temperatura ambiente. Dissolveu-se o DNA em 300 μ L de 8mM de NaOH.

O DNA e RNA foram posteriormente quantificados por espectroscopia no NanoDrop (ND-1000).

2.4. Análise do estado de metilação da ilha CpG do *LRP1B*

2.4.1. Identificação, *in silico*, da ilha CpG do *LRP1B*

Pela utilização da ferramenta CpG Plot foi identificada *in silico*, uma ilha CpG (828pb) que abrange a região não traduzida da extremidade 5' (5'UTR), exão 1 e intrão 1 do gene *LRP1B*. Pela impraticabilidade de avaliar o estado de metilação na totalidade da ilha em material fixado e embebido em parafina, seleccionou-se um fragmento de 230pb da ilha, que apresenta um elevado número de dupletos CG (repetição de 8 CCG). Este fragmento contém o local de início da transcrição (ATG), e um polimorfismo C/G, que resulta na introdução de um duplete CG adicional (SNP na posição 29*) (Fig.12A). De agora em diante designaremos este fragmento da ilha por Fragmento 2.

2.4.2. Conversão de Bissulfito

Após extracção dos ácidos nucleicos procedeu-se à conversão de 2µg de DNA pelo uso de bissulfito de sódio (*EpiTect Bisulfite Kit* (QIAGEN)) sem alterações ao recomendado pelo fabricante. Este método consiste na conversão química das citosinas não-metiladas em uracilos, mantendo-se as citosinas metiladas intactas (Fig.13A(a)). Esta conversão é conseguida pela incubação do DNA com elevadas concentrações de sais bissulfito a altas temperaturas e baixo pH. É necessário purificar o produto de conversão para remover os sais de bissulfito e químicos usados no processo, que podem inibir reacções subsequentes. A purificação foi feita pela passagem do produto de conversão por uma coluna de sílica com afinidade para a cadeia de DNA. Foram realizadas lavagens para remoção do grupo sulfonato, remoção do agente de desulfonação e finalmente o DNA foi eluído.

2.4.3. Amplificação de DNA convertido

Após purificação do DNA convertido, procedeu-se à amplificação, por PCR, que resulta na substituição dos uracilos por timinas. Na sequenciação do fragmento pretendido é possível observar quais os resíduos de Citosina inicialmente metiladas no DNA (Fig.13A(b)). Para amplificação do fragmento pretendido utilizou-se uma estratégia de *Nested* PCR, tendo sido desenhados dois pares de *primers* (Tabela 4A). A sequência utilizada para desenhar *primers* foi modificada *in silico*, de modo a prever a sequência do fragmento na forma convertida não metilada e convertida metilada. Foi utilizada a sequência convertida metilada para desenhar *primers*. Estes foram colocados em regiões que não incluem dupletos CG e de forma a abranger o maior número possível de dupletos CG na região intra-*primers*. Os *primers* foram desenhados de forma a originar fragmentos de ~200pb, para fazer face à

elevada fragmentação do DNA nos tecidos embebidos em parafina. As reacções de PCR foram realizadas para um volume final de 25µL (Tabela 5A). Para cada conjunto de reacções de PCR incluiu-se sempre um controlo positivo e um controlo negativo, que consistia na mistura reacconal, com excepção do DNA/produto de PCR externo. O produto de *Nested* PCR foi corrido num gel de agarose (3%) e as bandas com ~230pb foram cortadas. As bandas de DNA foram purificadas pela utilização de uma coluna de sílica, à qual se liga o DNA (*EasySpin DNA Gel Extraction Kit*, Citomed).

2.4.4. Clonagem do fragmento amplificado por PCR

Clonou-se o produto de PCR purificado no vector pCR2.1 fornecido no *TOPO TA Cloning Kit* (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Este método consiste numa reacção de ligação do produto de PCR, catalizada pela T4 DNA ligase, ao vector pCR2.1, seguindo-se da transformação de células competentes *E.coli* TOPO10 pelo método de choque térmico (42°C, 30''). Após plaqueamento destas células transformadas em meio selectivo (Ampicilina) procede-se à expansão de colónias individuais e extracção de DNA plasmídico.

2.4.5. Sequenciação de DNA

O produto de PCR ou do DNA plasmídico foram sujeitas a sequenciação directa pelo método enzimático de Sanger (*Kit Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing*, *Perkin Elmer Applied Biosystems Division*) no sequenciador ABI Prism 3100 Genetic Analyser (*Perkin Elmer*).

2.5. Tratamento com 5-Aza-CdR e TSA

Para os tratamentos com 5-Aza e TSA, foram plaqueadas 1×10^5 células das linhas ARO, KAT-4, XTC-1 e K1. No dia seguinte as células foram mantidas em meio contendo 2,5µM e 5µM de 5-Aza-CdR (SIGMA). Os meios correspondentes a cada condição de 5-AzaCdR foram renovados diariamente até ao 5º dia. Nas condições TSA e 5-Aza + TSA, adicionou-se 100nM de TSA (SIGMA) ao 4º dia e 16h pós adição de TSA, parou-se a experiência, pela adição de 1mL de Trizol e extracção de ácidos nucleicos.

2.6. Transfecção de linhas celulares com siRNAs (siDNMT1, siHMTs)

No 1º dia procedeu-se ao plaqueamento de 1×10^5 células em placas de 6 poços; No dia 2, 1 hora antes da transfecção, as células foram colocadas em meio sem PenStrep. Para realizar a transfecção recorreu-se ao uso de Lipofectamina (Invitrogen). As transfecções foram realizadas em triplicados. Foram utilizados dois controlos que consistiram de um MOK (só reagentes de transfecção) e si Controlo (QUIAGEN). Para cada poço foram usados 3µL de Lipofectamina em 50µL de Optimem. Após incubação (5') adicionou-se uma solução

previamente preparada contendo 0,5µL de siRNA (50µM, Ambion) em 50µL de Optimem e incubou-se a mistura durante 20' e adicionou-se 100µL a cada poço. Ao 3º dia retirou-se o meio com reagentes de transfecção e as células foram mantidas em RPMI completo. Ao 4º dia adicionou-se 1mL de reagente Trizol para extracção de DNA/RNA.

2.7. RT-PCR quantitativo

Para se proceder à quantificação da expressão de *LRP1B* ao nível do mRNA, por PCR quantitativo em tempo real o RNA total, obtido por extracção com Trizol, foi utilizado para síntese de cDNA (Reacção de transcrição reversa – RT). Para a síntese de cDNA utilizou-se 1µg do RNA total. A reacção de RT-PCR foi realizada com recurso ao método que utiliza sondas TaqMan (Applied Biosystems). Este método consiste na amplificação de um fragmento de PCR, mediado pela hibridação de sonda e *primers*, e pela extensão, resultante da actividade da Taq DNA polimerase. Durante a reacção, uma sonda, complementar ao fragmento amplificado, contendo dois fluoróforos nas extremidades, hibridiza com as moléculas resultantes da amplificação. A extensão da cadeia leva à destruição da sonda, pela actividade 3'→5' endonuclease da Taq DNA polimerase, e consequente libertação do fluoróforo que, afastado do *quencher*, emite fluorescência. Este sinal luminoso, detectado pelo termociclador de qPCR, é directamente proporcional ao fluoróforo libertado e à quantidade de DNA molde.

Foram utilizados os reagentes (*primers* e sonda) fornecidos nos ensaios de expressão genética (Hs01069121_m1 - Exões 32-33; Hs00218582_m1 - Exões 89-90, Applied Biosystems). Para descartar a possibilidade de a diminuição de expressão observada ser devida a deleção dos exões nos quais a sonda hibridiza utilizaram-se dois ensaios distintos para detecção da expressão. A expressão do *LRP1B* foi quantificada pelo método de quantificação absoluta. Foram incluídas na placa reacções correspondentes a diluições seriadas, para construção de uma recta padrão (Ct/quantidade). Com base nesta recta padrão, a quantidade de transcrito foi extrapolada, a partir do valor de Ct. Na mesma placa, foi realizada a quantificação de um controlo endógeno (huPO ou GAPDH), utilizando a mesma amostra de cDNA. Todas as reacções foram realizadas em duplicados técnicos. O PCR em tempo real foi realizado no termociclador ABI PRISM 7000 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems), de acordo com o seguinte perfil térmico: 1 ciclo de 95°C durante 10' e 45 ciclos de uma incubação inicial a 95°C durante 15'' seguida de outra a 60°C durante 1'. Foram obtidos valores de expressão normalizada através do cálculo da razão LRP1B/controlo endógeno.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A relevância do estudo de mecanismos genéticos e epigenéticos na inativação de genes supressores tumorais, surge como tentativa de esclarecer o papel destes genes na carcinogénese. A inativação do gene *LRP1B*, quer por mecanismos genéticos quer epigenéticos, foi abordada noutros tipos de tumores, apesar de permanecer em grande parte desconhecido o seu papel funcional na carcinogénese^{23,34,36}. Em tumores da tireóide, o papel deste gene nunca foi estudado. Estudos preliminares deste grupo de investigação observaram que o *LRP1B* (um gene localizado num dos *locus* de susceptibilidade para CNMTF, 2q21), se encontra frequentemente sub-expresso em tumores da tireóide, comparativamente com o tecido normal, realçando a possível implicação na carcinogénese das formas esporádicas e familiares de cancro da tireóide. O silenciamento transcricional de genes supressores tumorais, através da metilação do promotor, em regiões ricas em CpG, tem sido identificado em diversos tipos de tumores. O *LRP1B* possui uma ilha CpG (828pb), identificada *in silico*, que abrange parte da região não traduzida da extremidade 5' (5'UTR), exão 1 e intrão .

3.1. Estado de metilação da ilha CpG do *LRP1B* em linhas celulares de carcinoma da tireóide

Investigou-se o estado de metilação do Fragmento 2 da ilha CpG do *LRP1B* em linhas celulares de cancro da tireóide.

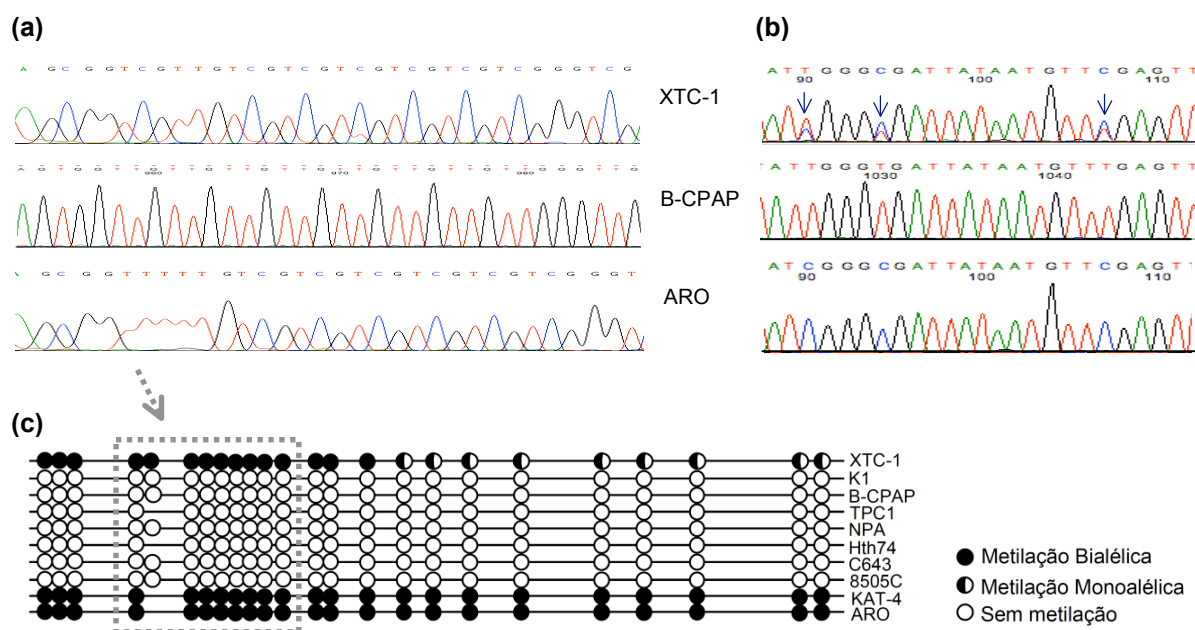


Figura 1 – Metilação de DNA em Linhas Celulares de carcinoma da tireóide. (a), Cromatogramas obtidos após conversão bissulfito. (b), Cromatogramas de metilação monoalélica relativa à linha celular XTC-1 (com metilação), B-CPAP (ausência de metilação) e ARO (metilação bialélica). (c), Representação esquemática dos resultados de metilação de *LRP1B* nas linhas celulares. Adenina (A), Timina (T), Guanina (G), Citosina (C).

Na Figura 1a e 1b estão apresentados os cromatogramas referentes a sequenciação do fragmento 2 da ilha CpG do *LRP1B*. Através da análise da sequência obtida após conversão por bissulfito, é possível identificar as citosinas que sofreram metilação. A representação esquemática da Figura 1c apresenta o estado de metilação dos 24 locais CG (incluindo o CG criado pelo SNP29) na região em estudo. Pode observar-se uma metilação extensa e densa (metilação bialélica) nas linhas KAT-4 e ARO, enquanto a linha XTC-1 apresenta metilação completa em alguns CGs, bem como dinucleótidos CG parcialmente metilados (metilação monoalélica ou hemimetilação). Nas restantes linhas celulares (K1, B-CPAP, TPC1, NPA, Hth74, C643 e 8505C) não se observou metilação no fragmento em estudo. Com o intuito de caracterizar mais detalhadamente a metilação nas linhas celulares XTC-1, KAT-4 e ARO, procedeu-se à clonagem do fragmento 2, e subsequente sequenciação do DNA plasmídico de clones isolados. Na Figura 2 encontram-se representados os resultados do estado de metilação de cerca de 5 clones por cada linha. Diferentes clones apresentam um padrão de CGs metilados distinto, o que sugere que a metilação é clonal. Esta observação de distintos padrões de metilação em sub- clones tumorais encontra-se descrita e está em concordância com a literatura⁶⁶.

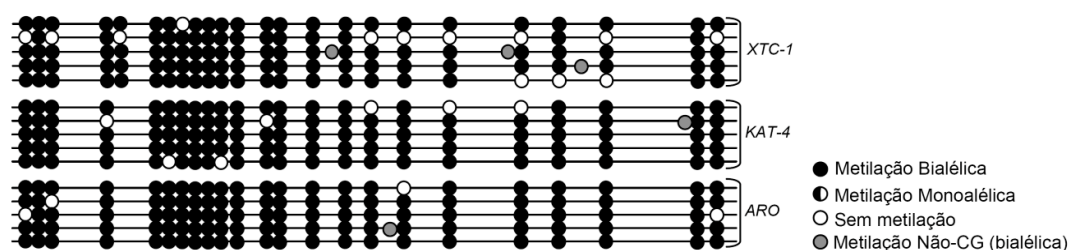


Figura 2 – Representação da metilação em diferentes produtos de clonagem obtidos nas linhas XTC-1, KAT-4 e ARO.

3.2. Relação funcional entre metilação da ilha CpG e expressão do *LRP1B*

3.2.1. Correlação entre o estado de metilação e os níveis de expressão de *LRP1B*

Com o objectivo de correlacionar o estado de metilação do promotor com os níveis de expressão endógena do *LRP1B*, foi quantificada a expressão do *LRP1B* em RNA das 10 linhas celulares de cancro da tireóide disponíveis (Fig.3). Os níveis de expressão de *LRP1B* nas linhas celulares de tireóide são distintos entre si, embora seja de salientar que são sempre inferiores à expressão obtida num *pool* de tireóides normais ($1,64 \times 10^2$). É também de notar que as linhas celulares com metilação da ilha CpG do *LRP1B*, KAT-4, ARO e XTC-1, apresentam níveis de expressão muito reduzidos (XTC-1), ou quase indetectáveis (ARO e KAT-4). Embora algumas das linhas celulares sem metilação (Hth74 e C643) apresentem níveis de expressão maiores, existem linhas celulares com baixa expressão do *LRP1B*, nas quais não é observada metilação (NPA, K1, B-CPAP, TPC1, 8505C). Esta última

observação sugere a existência de outros mecanismos de silenciamento do *LRP1B*, que não a metilação do promotor. Relativamente às linhas ARO, KAT-4 e XTC-1, a densidade e extensão da metilação observada (Fig.1 e 2) pode explicar o grau de inativação transcricional. A metilação bialélica, densa e extensa, observada nas linhas KAT-4 e ARO, está associada a um quase silenciamento do gene. Comparativamente, a linha XTC-1 apresenta, em alguns CGs, metilação monoalélica, presumindo-se que os clones sem metilação sejam competentes no que toca à actividade transcricional do promotor do *LRP1B*, e originem níveis de mRNA detectáveis.

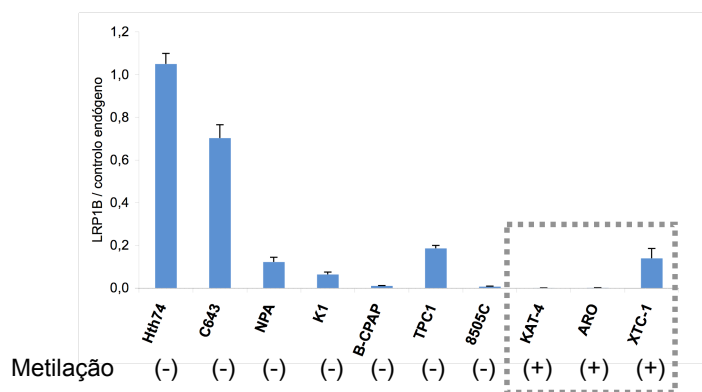


Figura 3 – Expressão normalizada de *LRP1B* nas linhas celulares de carcinomas da tireóide (sonda X89-90). Correlação dos níveis de expressão com metilação do promotor.

3.2.2. Efeito de agentes desmetilantes

3.2.2.1. 5-Aza-CdR

Com o propósito de validar funcionalmente o papel da metilação de DNA na regulação da expressão do *LPR1B*, procedeu-se ao tratamento de linhas celulares em que a ilha CG do *LRP1B* se encontra metilada, com um agente desmetilante (5-Aza). Foi também investigado um potencial efeito da acetilação de histonas na cooperação com a metilação de DNA, pela utilização de um inibidor de Desacetilases de Histonas, a Tricostatina A (TSA). Após o tratamento com 5-Aza, o estado de metilação da ilha foi avaliado para confirmar que o tratamento tinha realmente resultado na desmetilação dos dupletos de CGs (Fig.4).

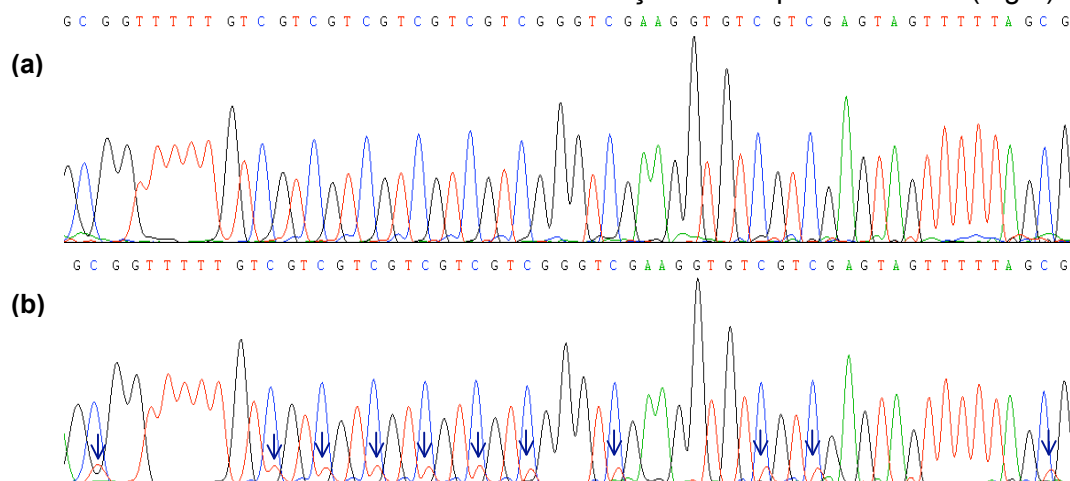


Figura 4 - Confirmação do efeito da desmetilação na linha celular ARO. (a) N.T. (não-tratado); (b) 5-Aza-CdR (5 μM). Os locais assinalados com "setas" representam o surgimento de picos de Timina, resultante de desmetilação.

Foram utilizadas 2 concentrações de 5-Aza-CdR (2,5 e 5 μ M), no tratamento da linha celular ARO (Fig.5a), bem como controlos, que consistiram de células não tratadas e células tratadas com o solvente da 5-Aza (DMSO). Pela análise da sequência do fragmento 2 da linha ARO após tratamento com 5-Aza, observámos o surgimento de picos de timina, correspondes a desmetilação (Fig.4).

A expressão foi avaliada por RT-qPCR. A comparação da expressão do *LRP1B*, entre células não tratadas/DMSO e células sujeitas ao tratamento com 5-Aza, revela um aumento de 100X na expressão do *LRP1B* (Log10=2), indicando que o tratamento com 5-Aza induz a re-expressão do *LRP1B*, nas duas concentrações utilizadas. Na Figura 5b está representada a expressão de *LRP1B* nas linhas celulares tratadas com 5-Aza (5 μ M), TSA e combinação dos dois agentes. Na linha celular ARO, verifica-se re-expressão do *LRP1B* pelo tratamento com TSA. A expressão é maior na condição com 5-Aza, e aumenta com a combinação dos dois fármacos. Na linha XTC-1, a re-expressão do *LRP1B* só foi observada após tratamento com 5-Aza e TSA, mas nenhum dos compostos, isoladamente, induz re-expressão. Por outro lado na linha KAT-4 não foi observada re-expressão em nenhuma das condições. Estas experiências foram também realizadas numa linha sem metilação na ilha do *LRP1B* (linha celular K1). Nesta linha observou-se uma re-expressão do *LRP1B* na ordem das duas vezes, considerando-se que este nível de aumento de expressão resulta de efeitos inespecíficos da 5-Aza, não relacionados com a metilação/desmetilação do promotor do *LRP1B*.

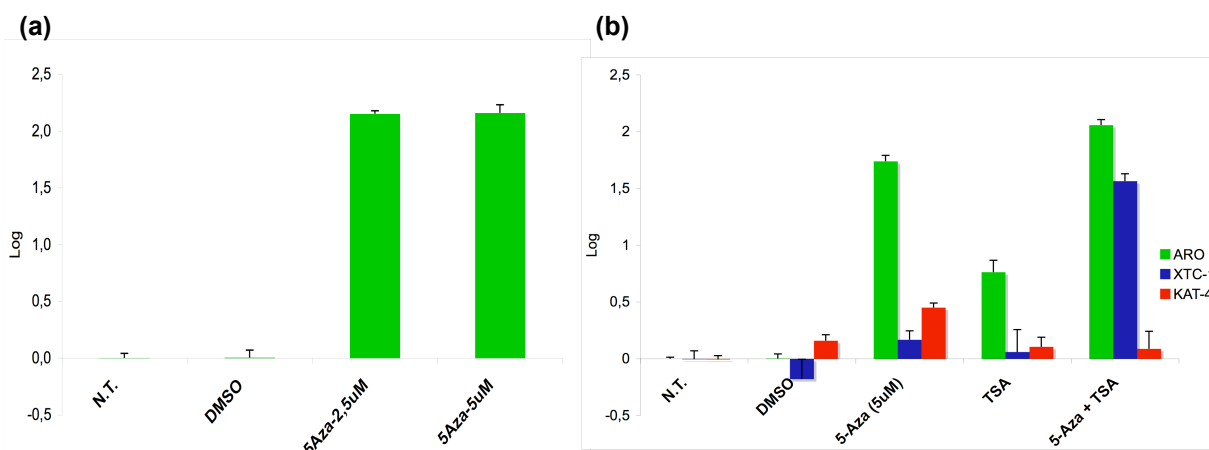


Figura 5 – Tratamentos com 5-Aza e TSA. (a), Expressão relativa do *LRP1B* na linha celular ARO, nas condições N.T. (não-tratado), DMSO, 5-AzaCdR (2,5 e 5 μ M). (b), Expressão relativa do *LRP1B* nas linhas celulares ARO, XTC-1 e KAT-4, nas condições N.T., DMSO, 5-Aza (5 μ M), Tricostatina A (TSA) e 5-Aza+TSA.

A observação de re-expressão do *LRP1B* em apenas algumas das linhas celulares metiladas e sujeitas a tratamento com agentes desmetilantes, sugere a presença de outros mecanismos alternativos, que possam estar a regular negativamente a expressão do *LRP1B*. A alteração de apenas um desses mecanismos (metilação), nem sempre parece resultar no desbloqueio da actividade transcricional. Isto é bem ilustrado na linha XTC-1, em

que apenas a indução de acetilação (pelo TSA) e simultânea desmetilação do promotor (5-Aza) conduz à re-expressão do *LRP1B*. Na linha ARO estes mecanismos têm efeito na actividade transcricional de forma isolada e mostram um ligeiro sinergismo entre si, indicando que metilação de DNA e modificação de histonas podem cooperar no silenciamento da expressão. Na linha celular KAT-4 não se observam alterações na expressão após tratamento com 5-Aza e TSA. Estes resultados reforçam a ideia de diferentes linhas celulares estarem subjacentes a mecanismos de regulação distintos. A regulação por diferentes mecanismos pode explicar a resposta desigual, aos agentes desmetilantes, nas linhas celulares XTC-1, KAT-4 e ARO.

3.2.2.2. siDNMT1

Outra abordagem experimental pela qual é possível avaliar o efeito na expressão de genes da metilação em promotores, consiste na utilização de siRNA para inibição da DNMT1. A inibição da DNMT1, leva à diminuição da metilação de manutenção mediada pela DNMT1 conduzindo à diminuição da metilação do DNA caso o tratamento se prolongue ao longo das divisões celulares. Para isso foram feitas transfecções de siRNA de dois em dois dias, durante cinco dias.

Na Figura 6 está representada a expressão de *LRP1B* após transfecção com siDNMT1, relativamente ao siControlo, em cada uma das linhas celulares estudadas. Observa-se um aumento de expressão apenas na linha celular ARO. A inibição da DNMT1 foi confirmada medindo a expressão de DNMT1 (Fig.6, *inset*).

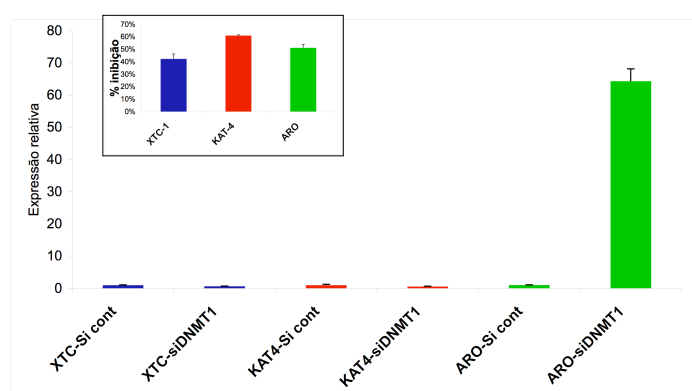


Figura 6 – Expressão relativa do *LRP1B* nas linhas celulares XTC-1, KAT-4 e ARO, nas condições Si controlo e Si DNMT1.
Inset - Média da inibição de DNMT1 (%) nas linhas celulares XTC-1, KAT-4 e ARO.

Apesar da transfecção com siDNMT1 ter sido menos eficiente que os tratamentos farmacológicos com 5-Aza-CdR, verifica-se uma concordância entre as duas estratégias de desmetilação. Enquanto que as linhas XTC-1 e KAT-4 não re-expressam *LRP1B*, seja após siDNMT1, seja por tratamento com 5-Aza, a linha celular ARO apresenta uma elevada recuperação da expressão de *LRP1B*, tanto por inibição com siRNA, como por exposição à 5-Aza indicando que a expressão de *LRP1B* nesta linha é principalmente regulada por metilação do promotor.

3.3. Estado de metilação da ilha CpG do *LRP1B* em Tumores da tiróide

Para tentar verificar se os resultados observados no modelo *in vitro* são relevantes na carcinogénese da tiróide, procedeu-se ao estudo do estado de metilação da ilha CG do *LRP1B* em amostras de tiróide normal e numa série de lesões pré-malignas (AFTs) e cancros da tiróide (CFTs, CPTs, CATs, CNMTFs) (Fig.7). Observou-se uma distribuição heterogénea da metilação nos tumores estudados. Em conjunto, 40% dos casos analisados apresentam metilação do *LRP1B*. O padrão e a frequência de metilação são variáveis (Tabela 1), sendo a maior frequência encontrada nos CATs. A presença de metilação nos AFTs sugere que a metilação do *LRP1B* será um evento precoce na carcinogénese. É de salientar a total ausência de metilação nas amostras de tecido normal.

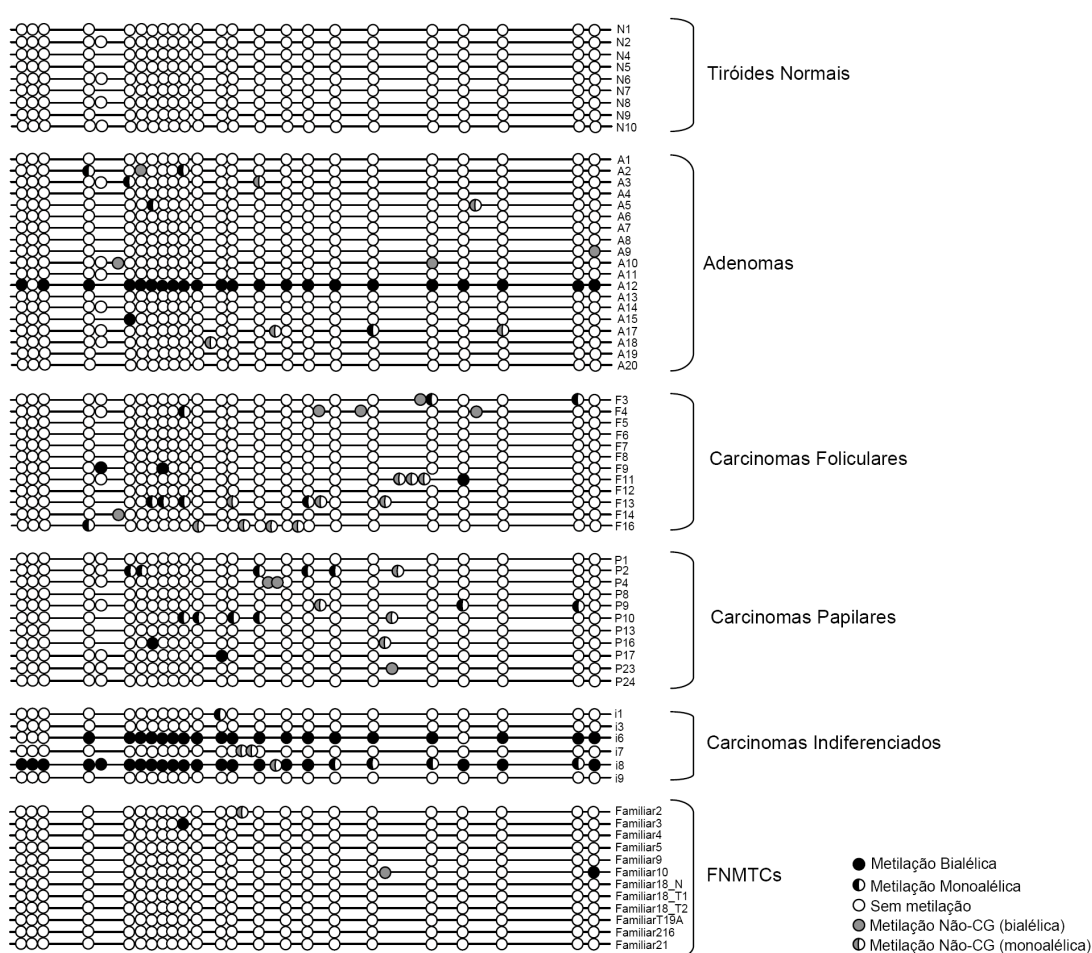


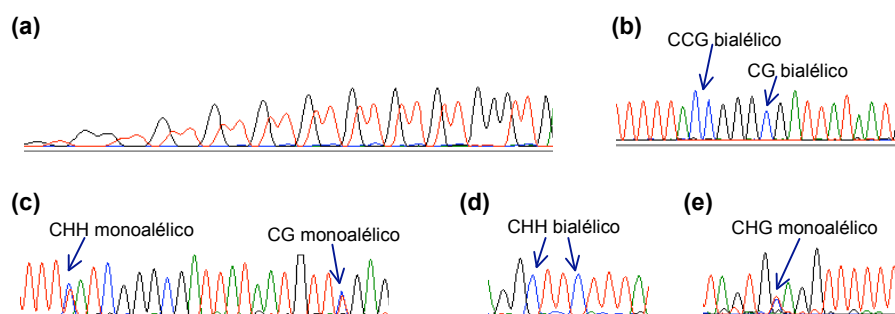
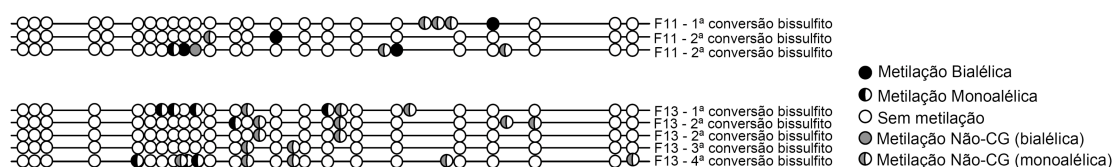
Figura 7 – Resultados obtidos no estudo de metilação do promotor do *LRP1B* em Tiróide Normal (n=9), Tumores esporádicos (Adenomas (n=19), Carcinomas Foliculares (n=12), Carcinomas Papilares (n=11), Carcinomas Indiferenciados (n=6)), e Tumores familiares (incluindo Normal Fam18/Noé; n=12).

A distinção evidente entre normal e tumor através do estado de metilação da ilha do *LRP1B*, leva-nos a propor a metilação do *LRP1B* como um biomarcador tumoral de elevada especificidade embora com baixa sensibilidade.

Tabela 1 – Frequência da metilação em linhas celulares, tiróides normais, tumores esporádicos e familiares.

		Total de casos		nº casos com metilação	Frequência de metilação	
		inicial	analizados			
Linhas celulares		10	10	3	3/10	30,0%
Tiróides Normais		10	9	0	0/9	0,0%
Tumores	Adenomas	20	19	9	9/19	47,4%
	Foliculares	17	16	7	7/16	43,8%
	Papilares	24	11	7	7/11	63,6%
	Indiferenciados	10	6	4	4/6	66,7%
	Familiares	12	11	3	3/11	27,3%
Total		103	82	33	33/82	40,2%

Relativamente ao padrão de metilação, é de notar que observámos a ocorrência de metilação em locais clássicos de dinucleótidos CG, bem como em locais não-CG (CCG ou CHH, H=A, T ou G), em simultâneo no mesmo tumor. Na Figura 8 encontram-se representados cromatogramas a ilustrar diferentes tipos de metilação. Com o objectivo de descartar a hipótese de estas observações corresponderem a artefactos na conversão por bissulfito, realizou-se um estudo comparativo do perfil de metilação entre diferentes conversões e diferentes amplificações, para verificar a reprodutibilidade deste tipo de metilação (Fig.9).

**Figura 8** – Cromatogramas exemplificativos de diferentes padrões de metilação. (a), Ausência de metilação (Tiróide normal), (b), Metilação CCG e CG bialélica, (c), Metilação CHH e CG monoalélica, (d), Metilação CHH bialélica, (e), Metilação CHG monoalélica. (H=T, A ou G)**Figura 9** – Representação de padrões de metilação nos casos de CFT 11 e 13, obtidos após conversões de bissulfito e Nested PCR independentes.

Verifica-se que, para o mesmo caso, diferentes conversões de bissulfito (da mesma extracção de DNA) ou diferentes amplificações da mesma conversão, continuam a resultar na observação de metilação tanto em locais CG, como não-CG, embora em diferentes padrões. Em mamíferos, a metilação de DNA ocorre preferencialmente em citosinas num

contexto de dinucleótidos CG. A metilação em locais não-CG é observada em fungos e plantas. No entanto, alguns estudos têm observado a ocorrência de metilação em locais não-CG também em mamíferos, sugerindo que as células de mamíferos possuem também a capacidade de estabelecer e manter a metilação em locais não-CG (CWG, W=A ou T). Uma sequência particular C^mCWGG é sugerida como alvo deste tipo de modificação epigenética^{53,54}. Deste modo, apesar de controverso, as metilações ocorridas em locais não-CG foram ponderadas neste trabalho. Considerando a importância dos locais não-CG como alvos de metilação, procedeu-se à caracterização nucleotídica das bases localizadas a montante e a jusante da Citosina metilada. Esta caracterização consistiu na estimativa da frequência de cada nucleótido a flanquear a citosina metilada (Tabela 2a). Tentou-se estabelecer uma sequência consenso para os locais não-CG (TCG**C***CGNGH). Apesar das diferentes frequências obtidas, estas não diferem significativamente da frequência das bases no fragmento (Tabela 2b). Isto sugere a existência de um efeito estocástico.

Tabela 2 – Frequência das bases no fragmento 2. (a) frequência da base nas diferentes localizações a flanquear a citosina metilada; (b) frequência das bases na região em análise (total de nucleótidos=187). (N= qualquer base, H=A, T ou G).

(a)	base	base	base	C*	base	base	base	base	base
A	7,4%	9,3%	27,8%	1,9%	24,1%	9,3%	25,9%	20,4%	7,4%
T	46,3%	25,9%	18,5%	3,7%	31,5%	18,5%	24,1%	3,7%	29,6%
C	33,3%	38,9%	20,4%	94,4%	44,4%	25,9%	24,1%	29,6%	29,6%
G	13,0%	25,9%	33,3%	0,0%	0,0%	46,3%	25,9%	46,3%	33,3%
	T	C	G	C*	C	G	N	G	H

(b)	Nº	Freq.
A	25	13,47%
T	34	18,18%
C	72	38,50%
G	56	29,95%

A metilação em não-CGs ocorre simultaneamente com a metilação em CGs. Na Figura 10 encontra-se ilustrado o cromatograma de um caso no qual se observa a metilação num local CG, que é antecedido de uma metilação em não-CG, originando **C*C***G.

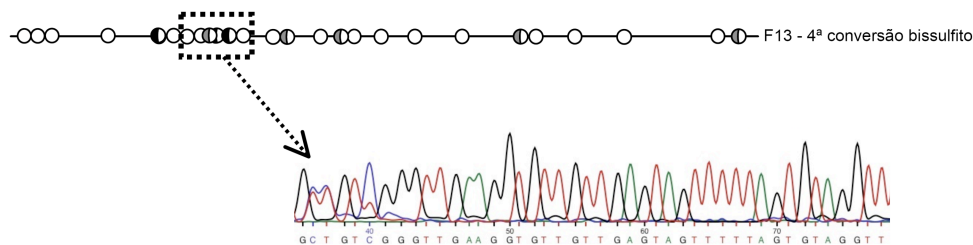


Figura 10 – Cromatograma exemplificativo de metilação em locais não-CG.

Estes resultados podem ser interpretados à luz de diversos estudos que analisaram a especificidade das DNMTs. A DNMT3a, que cataliza, juntamente com a DNMT3b, a metilação de novo, é ubiquitariamente expressa e, para além de possuir elevada especificidade para metilar em locais CpG, pode também metilar citosinas em dinucleótidos CpA e CpT⁵⁷. Deste modo, a metilação observada em locais não-CG poderá ser uma

metilação *de novo*, mediada por DNMT3a. A quantificação da expressão das diferentes DNMTs, em particular das metiltransferases *de novo*, poderia ser útil no sentido de explicar a presença de metilação em locais não-preferenciais. A presença de metilação em locais não-CG poderia explicar o facto de, em algumas linhas celulares, não ocorrer re-expressão do *LRP1B*. Como os métodos de desmetilação utilizados só inibem a actividade da DNMT1, nomeadamente 5-Aza e siDNMT1, estes resultariam apenas na desmetilação de locais CG. A existência de metilação em locais não-CG poderia assim manter o silenciamento transcricional.

3.4. Papel da Metilação de Histonas na expressão do *LRP1B*

A metilação de DNA parece estar intimamente associada com modificações pós-traducionais de histonas, nomeadamente a metilação de histonas. Como 2º objectivo deste trabalho, foi investigada a influência da metilação de histonas na regulação da transcrição do *LRP1B*, e a sua possível relação com a metilação de DNA no promotor do *LRP1B*.

Para estudar esta possível associação, foi inicialmente quantificada a expressão endógena de diferentes metiltransferases de histonas nas 10 linhas celulares de cancro da tiróide disponíveis (Fig.11). Foram quantificadas HMTs que metilam resíduos da lisina 9 (SUV39H1, SETDB1, G9a) e 27 (EZH2) da histona H3⁴⁵. Uma vez que estão envolvidas na aposição de marcas repressoras (H3K9 e H3K27), a actividade destas enzimas poderia explicar a inactivação do *LRP1B* em linhas celulares e tumores. Foi seleccionada a HMT com maior nível de expressão endógena nas linhas celulares - G9a para uma estratégia de silenciamento com siRNA. Esta experiência assentou no pressuposto de que a inibição de G9a, associada com a marca repressora H3K9me, conduziria ao aumento de expressão do *LRP1B*.

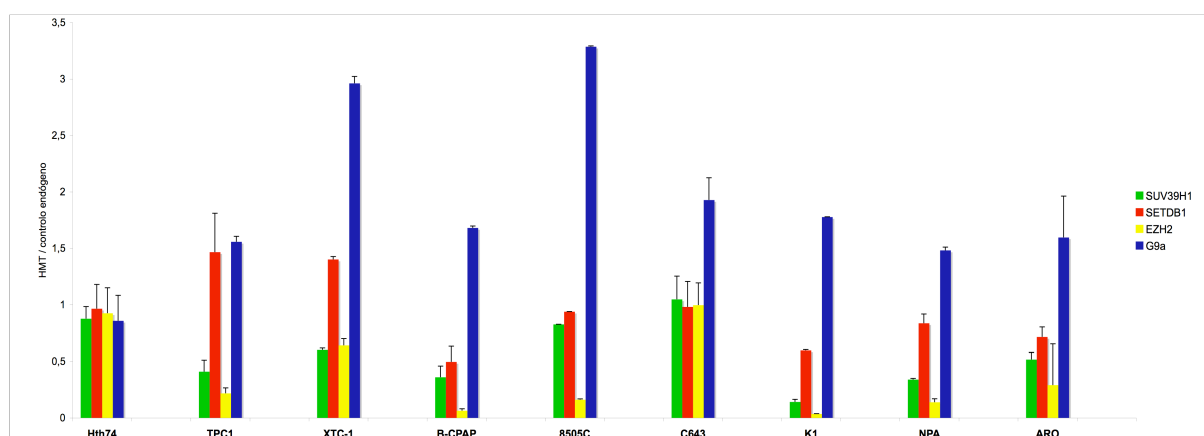


Figura 11 – Expressão normalizada das metiltransferases SUV39H1, SETDB1, EZH2 e G9a nas diferentes linhas celulares de carcinomas da tiróide.

Foram seleccionadas duas linhas celulares com padrão de metilação do promotor distinto, XTC-1 (com metilação) e TPC1 (sem metilação), apesar de ambas as linhas apresentarem níveis endógenos de expressão de *LRP1B* muito reduzidos (Fig.3). Confirmou-se o silenciamento da expressão de G9a relativamente aos controlos (MOK/agentes de transfecção e siControlo). Contrariamente ao esperado, a inibição da G9a resulta numa redução concomitante da expressão do *LRP1B* na linha TPC1 (Fig.12a). Na linha XTC-1, apesar da inibição da G9a ter sido eficiente, não se verificou alteração significativa na expressão de *LRP1B* (Fig.12b).

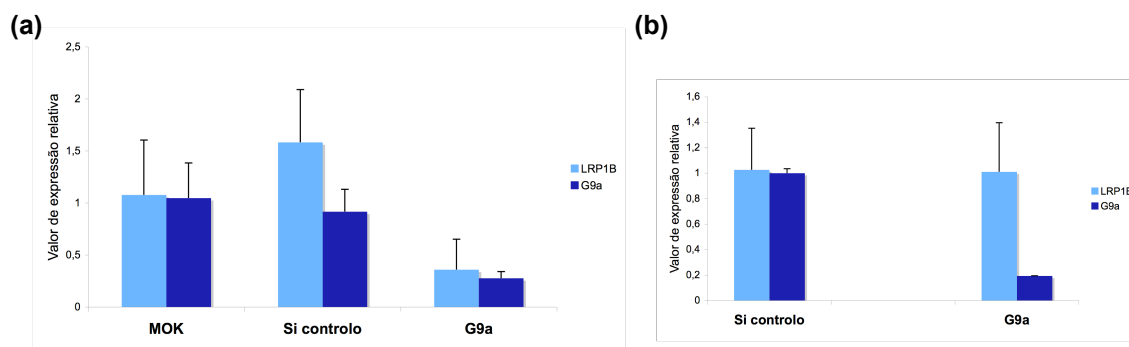


Figura 12 – Expressão relativa de *LRP1B* após silenciamento com siRNA para G9a. (a), Linha celular TPC1, (b), Linha celular XTC-1.

Relativamente à linha sem metilação de DNA (TPC1), o resultado obtido é precisamente oposto ao esperado. Isto sugere a existência de outro papel da G9a na regulação do *LRP1B*. A descrição da HMT em estudo (G9a) como co-activador transcricional para receptores nucleares, pela cooperação sinérgica com CARM1/PRMT4 e p300⁶⁷, pode contribuir para a explicação destes resultados. A PRMT4 consiste numa metiltransferase que actua em resíduos de arginina (H3R2, H3R17, H3R26), associados com marcas activadoras da transcrição³⁹. A inibição da G9a pode resultar na desestabilização do complexo G9a:CARM1/PRMT4, e na diminuição da metilação de argininas e redução da expressão do *LRP1B*.

A metiltransferase de histonas G9a parece actuar como co-activador ou co-repressor dependendo do contexto dos factores de transcrição e outros coreguladores no promotor. A eliminação da sua actividade de metiltransferase ou a presença de substrato não metilado poderá prevenir o seu funcionamento como co-repressor. Nesta situação, G9a pode funcionar como co-activador⁶⁷.

Para esclarecer estes resultados poderíamos recorrer à técnica de ChIP (*Chromatin Immunoprecipitation*) que nos permitiria identificar as modificações de histonas no promotor do *LRP1B* e esclarecer a possível correlação entre G9a e a metilação de argininas. Seria necessário utilizar anticorpos para histona H3 com argininas metiladas e, após

imunoprecipitação da cromatina, por PCR, pesquisar sequências de DNA do *LRP1B*, permitindo-nos assim avaliar a ocorrência de H3Rme na sequência do promotor do *LRP1B*.

Na linha com metilação de DNA no fragmento 2 (XTC-1), a inibição de G9a não alterou a expressão do *LRP1B*. Este facto indica a metilação de DNA como um mecanismo repressor que, *per se*, conduz à inactivação do *LRP1B*.

Em suma, a inibição da G9a, pode resultar na diminuição da metilação de Argininas (marca activadora) e consequente diminuição da actividade transcricional do *LRP1B*. Por outro lado, na linha com metilação de DNA, a inibição de G9a não alterou a expressão do *LRP1B*, o que sugere que a metilação de DNA pode actuar como um mecanismo de repressão dominante, independente da G9a, à luz da hipótese de que pode existir associação entre modificação de histonas e metilação do DNA. O facto de estas experiências terem sido realizadas em linhas celulares distintas dificulta a conjugação dos dois resultados numa explicação comum.

IV. CONCLUSÕES

Este trabalho permite-nos concluir que:

(1) O gene *LRP1B* encontra-se inactivado por metilação da ilha CG, em linhas celulares.

(2) A metilação densa e extensa da ilha correlaciona com o silenciamento da expressão deste gene (Linhas ARO e KAT-4).

(3) Na linha celular ARO, o tratamento com agentes desmetilantes, tais como 5-Aza e siDNMT1, resulta na re-expressão de *LRP1B*.

(4) Na série de tumores analisada, a metilação ocorre de forma heterogénea, quer em lesões benignas quer malignas. A metilação da ilha CpG do *LRP1B* é um evento específico de tumores e está totalmente ausente no tecido normal.

(5) A frequência do achado de metilação em locais não-CpG, tanto em linhas celulares como em tumores, merece investigação futura, na tentativa de correlacionar este tipo de metilação com a expressão do gene.

(6) A inibição da metiltransferase de histonas G9a induz um decréscimo na expressão do *LRP1B*. O papel dual de G9a, como co-activador e co-repressor, necessita de ser esclarecida.

A identificação da metilação de DNA como um mecanismo de regulação negativa deste potencial gene supressor de tumor, de forma específica em tumores da tiróide e não em tecido normal, sugere que este mecanismo pode ser explorado para desenvolvimento de um possível biomarcador, e de uma estratégia terapêutica. No entanto, é de salientar a evidente cooperação de diversos mecanismos subjacentes à completa inactivação do gene.

V. PERSPECTIVAS FUTURAS

Averiguar o efeito funcional da metilação em locais não-CG. Para este efeito, contruir um vector *reporter* com o fragmento da ilha CpG e proceder à sua metilação *in vitro*. Identificar a origem da metilação em não-CGs, inibindo, por exemplo, a DNMT3a, e investigando alterações no perfil de metilação.

Esclarecer o papel da metiltransferase G9a e da metilação de Argininas e Lisinas, no promotor do *LRP1B*, através do método de Imunoprecipitação da Cromatina (ChIP).

Clarificar a correlação da metilação de DNA e Histonas, através da utilização de experiências de activação e/ou inibição de HMTs e HDMs e análise da alteração do perfil de metilação de DNA.

VI. REFERÊNCIAS

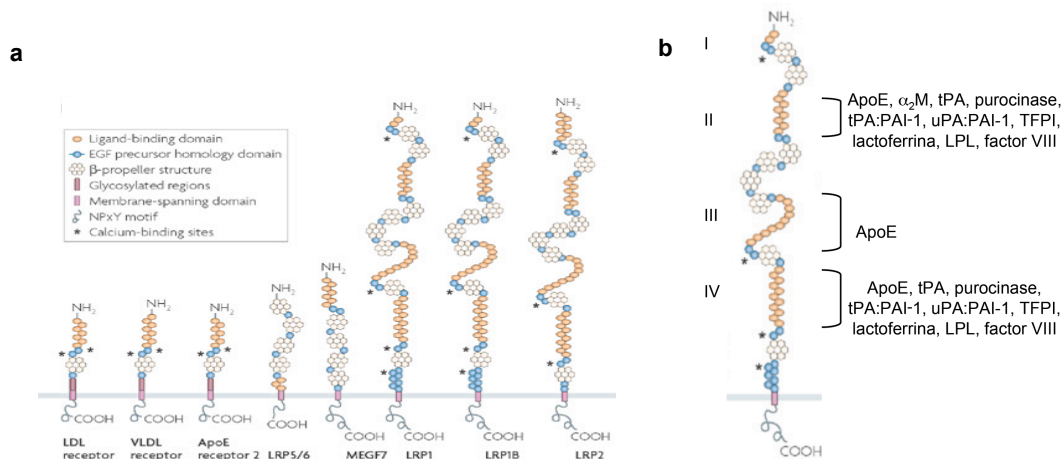
1. Junqueira, L. & Carneiro, J. *Histologia Básica*, 407-412 (Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004).
2. DeLellis, R.A., Lloyd, R.V., Heitz, P.U., Eng, C. & International Agency for Research on Cancer. *Pathology and genetics of tumours of endocrine organs*, 320 p. (IARC, Lyon, 2004).
3. Sobrinho-Simoes, M. et al. Intragenic mutations in thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am* **37**, 333-62, viii (2008).
4. DeLellis, R.A. Pathology and genetics of thyroid carcinoma. *J Surg Oncol* **94**, 662-9 (2006).
5. Sherman, S.I. Thyroid carcinoma. *Lancet* **361**, 501-11 (2003).
6. Couto, J.P. et al. How molecular pathology is changing and will change the therapeutics of patients with follicular cell-derived thyroid cancer. *J Clin Pathol* **62**, 414-21 (2009).
7. Trovisco, V. et al. A new BRAF gene mutation detected in a case of a solid variant of papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol* **36**, 694-7 (2005).
8. Prazeres, H.J. et al. Loss of heterozygosity at 19p13.2 and 2q21 in tumours from familial clusters of non-medullary thyroid carcinoma. *Fam Cancer* **7**, 141-9 (2008).
9. Dotto, J. & Nose, V. Familial thyroid carcinoma: a diagnostic algorithm. *Adv Anat Pathol* **15**, 332-49 (2008).
10. Malchoff, C.D. & Malchoff, D.M. Familial nonmedullary thyroid carcinoma. *Cancer Control* **13**, 106-10 (2006).
11. Ron, E. et al. A population-based case-control study of thyroid cancer. *J Natl Cancer Inst* **79**, 1-12 (1987).
12. Goldgar, D.E., Easton, D.F., Cannon-Albright, L.A. & Skolnick, M.H. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst* **86**, 1600-8 (1994).
13. Galanti, M.R., Ekbom, A., Grimelius, L. & Yuen, J. Parental cancer and risk of papillary and follicular thyroid carcinoma. *Br J Cancer* **75**, 451-6 (1997).
14. Hemminki, K. & Dong, C. Familial relationships in thyroid cancer by histo-pathological type. *Int J Cancer* **85**, 201-5 (2000).
15. Pal, T. et al. Increased risk for nonmedullary thyroid cancer in the first degree relatives of prevalent cases of nonmedullary thyroid cancer: a hospital-based study. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 5307-12 (2001).
16. Frich, L., Glatte, E. & Akslen, L.A. Familial occurrence of nonmedullary thyroid cancer: a population-based study of 5673 first-degree relatives of thyroid cancer patients from Norway. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**, 113-7 (2001).
17. Alsanea, O. et al. Is familial non-medullary thyroid carcinoma more aggressive than sporadic thyroid cancer? A multicenter series. *Surgery* **128**, 1043-50;discussion 1050-1 (2000).
18. Uchino, S. et al. Familial nonmedullary thyroid carcinoma characterized by multifocality and a high recurrence rate in a large study population. *World J Surg* **26**, 897-902 (2002).
19. Cavaco, B.M., Batista, P.F., Sobrinho, L.G. & Leite, V. Mapping a new familial thyroid epithelial neoplasia susceptibility locus to chromosome 8p23.1-p22 by high-density single-nucleotide polymorphism genome-wide linkage analysis. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 4426-30 (2008).
20. He, H. et al. A susceptibility locus for papillary thyroid carcinoma on chromosome 8q24. *Cancer Res* **69**, 625-31 (2009).
21. Li, Y., Marzolo, M.P., van Kerkhof, P., Strous, G.J. & Bu, G. The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* **275**, 17187-94 (2000).
22. Liu, C.X., Musco, S., Lisitsina, N.M., Yaklichkin, S.Y. & Lisitsyn, N.A. Genomic organization of a new candidate tumor suppressor gene, LRP1B. *Genomics* **69**, 271-4 (2000).
23. Liu, C.X. et al. LRP-DIT, a putative endocytic receptor gene, is frequently inactivated in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* **60**, 1961-7 (2000).
24. May, P., Woldt, E., Matz, R.L. & Boucher, P. The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions. *Ann Med* **39**, 219-28 (2007).
25. Herz, J. & Strickland, D.K. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* **108**, 779-84 (2001).
26. Wasan, K.M., Brocks, D.R., Lee, S.D., Sachs-Barrable, K. & Thornton, S.J. Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 84-99 (2008).
27. Liu, C.X., Li, Y., Obermoeller-McCormick, L.M., Schwartz, A.L. & Bu, G. The putative tumor suppressor LRP1B, a novel member of the low density lipoprotein (LDL) receptor family, exhibits both overlapping and distinct properties with the LDL receptor-related protein. *J Biol Chem* **276**, 28889-96 (2001).
28. Li, Y. et al. Low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein 1B impairs urokinase receptor regeneration on the cell surface and inhibits cell migration. *J Biol Chem* **277**, 42366-71 (2002).
29. Tanaga, K. et al. LRP1B attenuates the migration of smooth muscle cells by reducing membrane localization of urokinase and PDGF receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1422-8 (2004).
30. Song, H., Li, Y., Lee, J., Schwartz, A.L. & Bu, G. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes cancer cell migration and invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9. *Cancer Res* **69**, 879-86 (2009).
31. Zilberberg, A., Yaniv, A. & Gazit, A. The low density lipoprotein receptor-1, LRP1, interacts with the human frizzled-1 (HFz1) and down-regulates the canonical Wnt signaling pathway. *J Biol Chem* **279**, 17535-42 (2004).
32. Taylor, K.H. et al. Ultradeep bisulfite sequencing analysis of DNA methylation patterns in multiple gene promoters by 454 sequencing. *Cancer Res* **67**, 8511-8 (2007).

33. Taylor, K.H. et al. Large-scale CpG methylation analysis identifies novel candidate genes and reveals methylation hotspots in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* **67**, 2617-25 (2007).
34. Sonoda, I. et al. Frequent silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B (LRP1B) expression by genetic and epigenetic mechanisms in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* **64**, 3741-7 (2004).
35. Pineau, P. et al. Homozygous deletion scanning in hepatobiliary tumor cell lines reveals alternative pathways for liver carcinogenesis. *Hepatology* **37**, 852-61 (2003).
36. Nakagawa, T. et al. Genetic or epigenetic silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* **97**, 1070-4 (2006).
37. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
38. Knudson, A.G. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* **1**, 157-62 (2001).
39. Allis, C.D., Jenuwein, T. & Reinberg, D. *Epigenetics*, x, 502 p. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2007).
40. Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. & Jones, P.A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **429**, 457-63 (2004).
41. Guil, S. & Esteller, M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 87-95 (2009).
42. Baylin, S.B. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* **2 Suppl 1**, S4-11 (2005).
43. Shi, Y. Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. *Nat Rev Genet* **8**, 829-33 (2007).
44. Lee, B.M. & Mahadevan, L.C. Stability of histone modifications across mammalian genomes: Implications for 'epigenetic' marking. *J Cell Biochem* **108**, 22-34 (2009).
45. Volkel, P. & Angrand, P.O. The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie* **89**, 1-20 (2007).
46. Moving AHEAD with an international human epigenome project. *Nature* **454**, 711-5 (2008).
47. Klose, R.J. & Bird, A.P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* **31**, 89-97 (2006).
48. Szyf, M. Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **49**, 243-63 (2009).
49. Bleasby, A. Emboss CpGPlot. (European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK, 1999).
50. Esteller, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* **8**, 286-98 (2007).
51. Cedar, H. & Bergman, Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* **10**, 295-304 (2009).
52. Fraga, M.F. et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10604-9 (2005).
53. Lorincz, M.C. & Groudine, M. C(m)C(a/t)GG methylation: a new epigenetic mark in mammalian DNA? *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10034-6 (2001).
54. Malone, C.S. et al. CmC(A/T)GG DNA methylation in mature B cell lymphoma gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10404-9 (2001).
55. Watson, B., Munson, K., Clark, J., Shevchuk, T. & Smith, S.S. Distribution of CWG and CCWGG in the human genome. *Epigenetics* **2**, 151-4 (2007).
56. Jones, P.A. & Baylin, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* **3**, 415-28 (2002).
57. Turek-Plewa, J. & Jagodzinski, P.P. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* **10**, 631-47 (2005).
58. Struhl, K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* **12**, 599-606 (1998).
59. Hake, S.B., Xiao, A. & Allis, C.D. Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. *Br J Cancer* **90**, 761-9 (2004).
60. van Haaften, G. et al. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. *Nat Genet* **41**, 521-3 (2009).
61. Christman, J.K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* **21**, 5483-95 (2002).
62. Zhu, J. & Yao, X. Use of DNA methylation for cancer detection: promises and challenges. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 147-54 (2009).
63. Suzuki, M.M. & Bird, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* **9**, 465-76 (2008).
64. Schones, D.E. & Zhao, K. Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. *Nat Rev Genet* **9**, 179-91 (2008).
65. Schweppe, R.E. et al. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 4331-41 (2008).
66. Baylin, S.B. Mechanisms underlying epigenetically mediated gene silencing in cancer. *Semin Cancer Biol* **12**, 331-7 (2002).
67. Lee, D.Y., Northrop, J.P., Kuo, M.H. & Stallcup, M.R. Histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a is a transcriptional coactivator for nuclear receptors. *J Biol Chem* **281**, 8476-85 (2006).

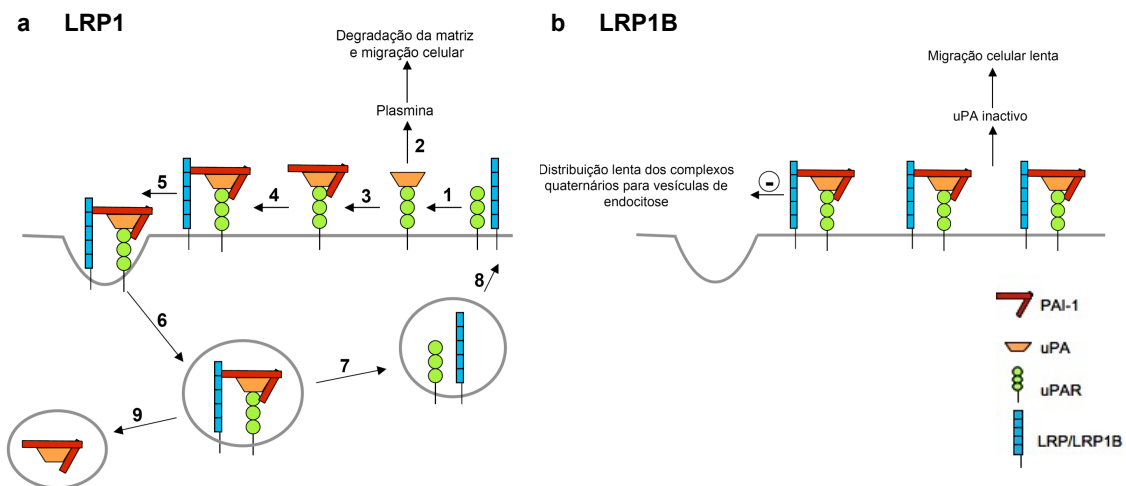
ANEXOS

Tabela 1A – Alterações moleculares em carcinomas da tireóide (adaptado de ^{3,4}).

		CPT (%)	CFT (%)	CPDT (%)	CAT (%)
Mutação	BRAF	36-83	0	13	25-35
	RAS	0-16 (25% CPT-VF)	40-50	15-25	4-60
	p53	2	2	25	20-86
	CTNNB1	0	0	25	66
Rearranjo	PAX8-PPAR γ	0	25-60	0	0
	RET/PTC	30	0	10	0
	NTRK1	10	-	-	-

**Figura 1A** – Família LDLR (adaptado de ²⁶).

a, Ilustração dos domínios estruturais de alguns membros da família LDLR; **b**, Representação dos *clusters* de ligação do ligando e respectivos ligandos do membro LRP1 (modificação da figura da Ref. ²⁶ baseado na Ref. ²⁵). Regiões estabilizadas pela ligação do cálcio (*); Apo, apolipoproteína; VLDL, *very low density lipoprotein*.

**Figura 2A** – Modelo alusivo às funções diferenciais de LRP1 e LRP1B na endocitose e regeneração de uPAR.

a, sequência de eventos do sistema uPA na presença de LRP1: 1) Ligação de uPA a uPAR; 2) após uPA se ligar ao receptor, há aumento da actividade da protease que converte plasminogénio em plasmina. A plasmina digere os componentes da matriz, facilitando a migração celular; 3) uPA é inativado pela ligação de PAI-1; 4) Ligação de PAI-1 também conduz à ligação de LRP e a formação de complexos quaternários; 5) Distribuição rápida de uPA:PAI-1uPAR:LRP para vesículas revestidas de clatrina devido aos sinais de endocitose de LRP; 6) endocitose e tráfego para endossoma; 7) distribuição de LRP e uPAR em vesículas que participam na reciclagem; 8) LRP e uPAR reciclados voltam para membrana plasmática, regenerando assim uPAR; 9) complexos uPAPAI-1 são entregues a endossomas/lisossomas tardios para degradação.

b, LRP1B mantém-se ligado a uPAR e PAI-1 na superfície da célula (adaptado de ²⁸).

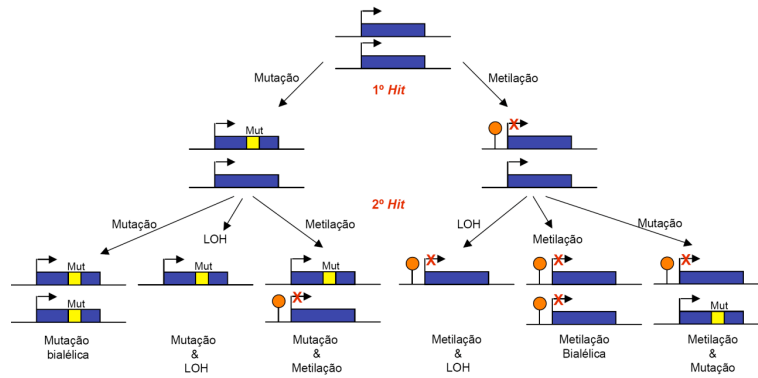


Figura 3A – Contribuição da metilação para a inativação de genes supressores tumorais (adaptado de ³⁹). No topo da ilustração, estão representados a azul dois alelos activos de um gene supressor de tumor. Na primeira etapa de inativação do gene, está representado um evento mutacional (à esquerda) e um evento epigenético – metilação de DNA (à direita). A segunda etapa de inativação ocorre por LOH (perda de heterozigotia), mutação e silenciamento transcricional por eventos epigenéticos adicionais. Deste modo, a metilação de DNA pode contribuir como uma ou ambas as etapas satisfazendo a hipótese de Knudson.

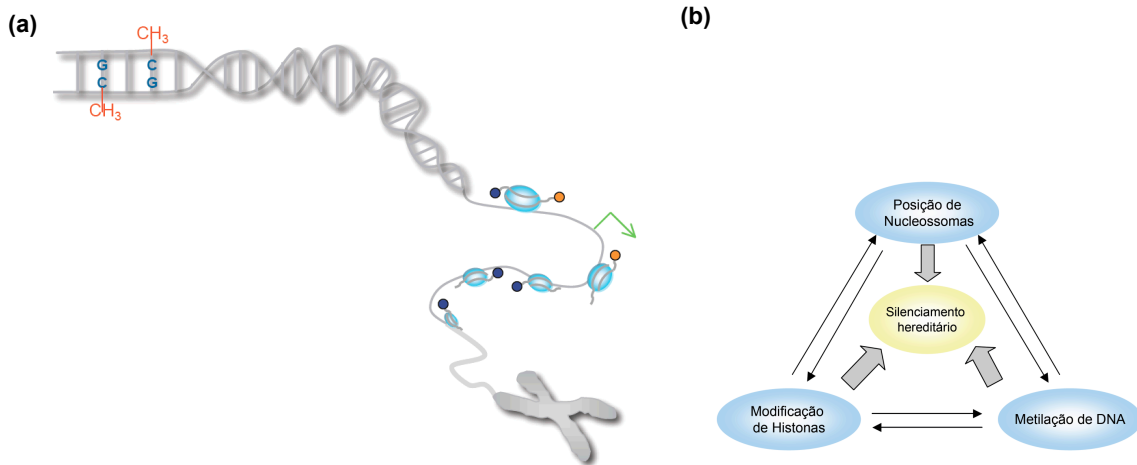


Figura 4A – Mecanismos de regulação epigenética (a), Representação do cromossoma, cromatina com nucleossomas, histonas com modificações epigenéticas, e metilação de DNA (adaptado de ⁴⁶); (bola azul – metilação; bola laranja – acetilação). (b), Interação entre modificação de histonas, metilação de DNA e posição do nucleossoma no silenciamento hereditário (adaptado de ⁴⁰).

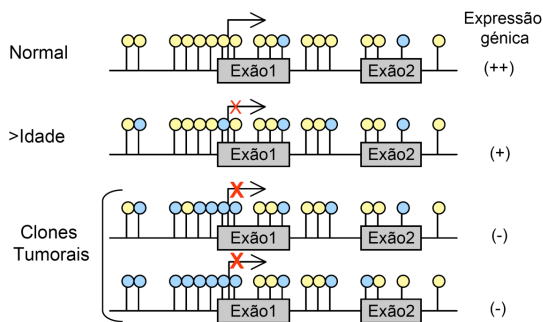


Figura 5A – Alteração do padrão de metilação de DNA na progressão tumoral (adaptado de ^{42,50,56,66}). Nas células normais, os CpGs na região promotora não se encontram metilados, resultando na expressão gênica. Com o aumento da idade, ocorre uma diminuição da expressão gênica, em função do aumento da metilação. A heterogeneidade observada no padrão de metilação dos diferentes clones tumorais condiciona propriedades importantes dos tumores, como a metastização. (A azul, CpG metilado; a amarelo, CpG não metilado).

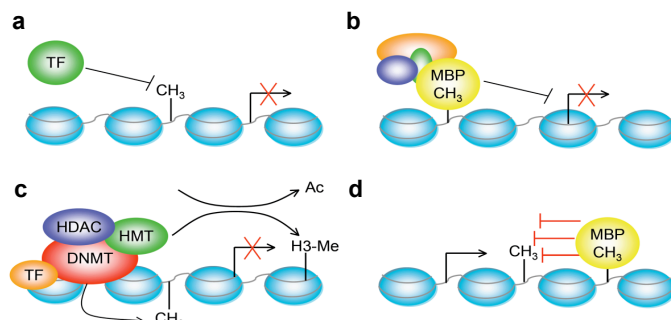


Figura 6A – Mecanismos de repressão mediados pela metilação de DNA (adaptado de ⁴⁷). a, A metilação de DNA bloqueia directamente a ligação de factores de transcrição; b, MBPs reconhecem DNA metilado e recrutam co-repressores que silenciam a expressão genética; c, DNMTs, para além da actividade catalítica, podem reprimir a iniciação da transcrição; d, metilação de DNA pode comprometer a fase de elongação da transcrição, pela redução da acessibilidade da cromatina.

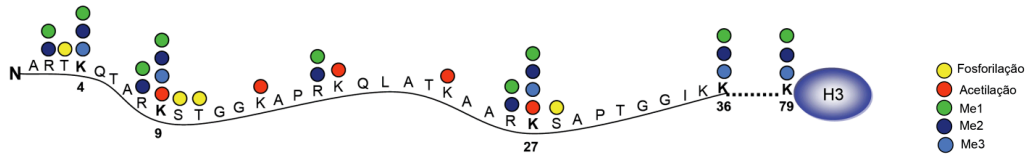


Figura 7A – Representação das modificações pós-traducionais na cauda da histona H3 (adaptado de ^{39,45}).

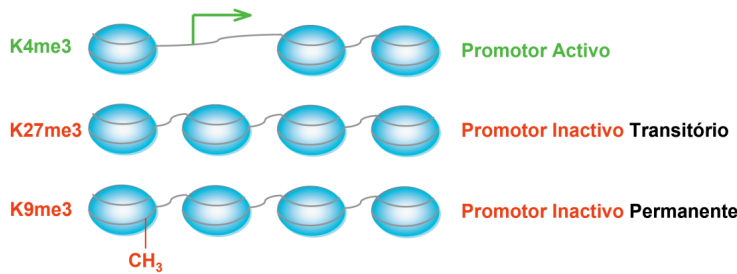


Figura 8A – Representação do promotor nos estados ativo, inativo transitório e inativo permanente em função da posição do nucleossoma, modificações de histonas e metilação de DNA.

Promotor ativo – metilação no resíduo K4 e remoção de um nucleossoma no local de início da transcrição; Promotor Inativo Transitório – H3K27me3; Promotor Inativo Permanente – H3K9me3 e metilação no DNA. (Peter Jones, comunicação oral, *Cancer Epigenetics and Biology Symposium in Barcelona*, IDIBELL)

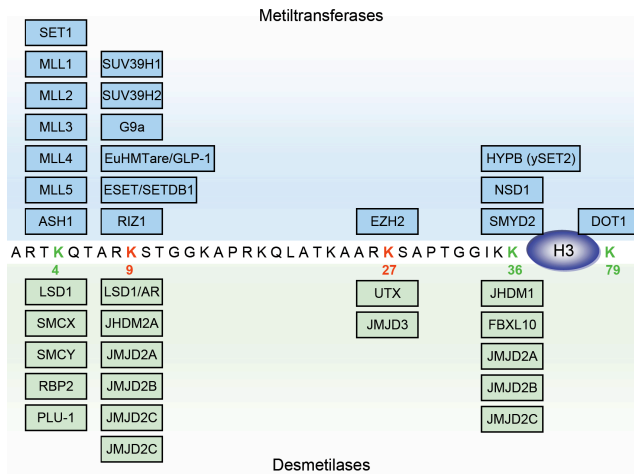


Figura 9A – Regulação dinâmica da metilação de histonas por HMTs e HDMTs (adaptado de ⁴³). Representação de parte da cauda da histona H3. Metilação associada com ativação da transcrição representada a verde e inativação a vermelho. Cada resíduo é metilado e desmetilado por enzimas específicas (metiltransferases no topo, desmetilases em baixo).

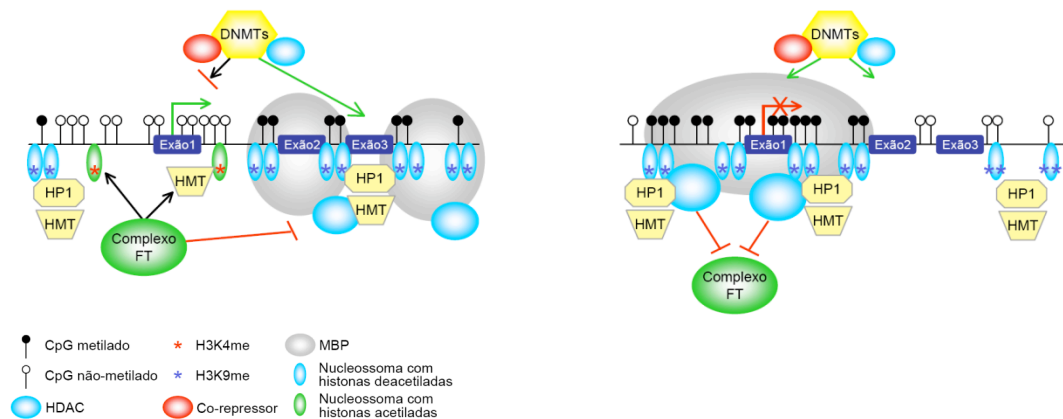


Figura 10A - Representação de um promotor rico em CGs, ativo e silenciado, com as respectivas modificações epigenéticas (adaptado de ⁵⁶) (a), promotor não metilado e transcricionalmente ativo, que contém uma ilha CpG. A ilha reside num domínio protegido da cromatina metilada que o flangeia. À volta do promotor estão nucleossomas, com espaçamento entre eles, que contêm histonas acetiladas nas quais o resíduo lisina 4 da H3 sofreu metilação por uma HMT. Por outro lado, a cromatina flangeadora, transcricionalmente reprimida, tem locais CpG metilados, MBP e HDAC. É altamente compactada e tem nucleossomas, com menor espaçamento entre eles, que contêm metilação em H3K9, mantida pelo complexo HP1-K9. Os complexos de DNMTs são excluídos da região promotora. (b), o mesmo promotor num estado hipermetilado, associado com repressão transcricional. A região promotora está acessível aos complexos de DNMT e cromatina transcritionalmente repressora ocupa o promotor, que é silenciado. Complexo FT: co-ativador, HAT e factor de transcrição; DNMT (DNA metiltransferase); HDAC (Desacetilase de histona); MBP (proteína de ligação a citosina metilada); HP1 (proteína de heterocromatina).

Tabela 2A – Métodos para análise de metilação de DNA e histonas (adaptado de ^{39,62-64}).

	Preparação da amostra			Vantagens	Desvantagens	Análise	
DNA	Conversão Bissulfito		Bissulfito de sódio converte citosinas não-metiladas em uracilos (citosinas metiladas são protegidas da conversão)		Aplicável a qualquer amostra Método com maior resolução (resolução de 1 base)	conversão completa – crucial.	MSP* ou MSP-TaqMan (>sensibilidade) Sequenciação <i>standard</i> ou em larga escala DNA microarrays: oligonucleótidos ou SNPs Espectrometria de Massa (<i>Sequeunom</i>)
	Restrição enzimática	RLGS; Ensaio HELP	DNA é fragmentado diferencialmente por uma enzima de restrição sensível a metilação	Após fraccionamento, o DNA metilado é enriquecido	Simples	Análise de metilação limitada aos locais de restrição	Sequenciação directa em larga escala DNA microarrays: oligonucleótidos ou SNPs
		Digestão com enzima McrBC		Após fraccionamento, o DNA não-metilado é enriquecido	Degradação efectiva da maioria do DNA metilado	–	
	Purificação por Afinidade	MedIP Imunop. de DNA metilado	Imunoprecipitação de DNA que contém citosinas metiladas (uso de anticorpo monoclonal).		Anticorpo comercial. Precipita citosinas metiladas em todos os contextos.	Necessária elevada densidade ^{m5} C	
		MAP (Afinidade com MBD)	Imunoprecipitação de DNA que contém CpG metilados (uso de coluna MBD).		Apenas CpGs metilados são recuperados.	Necessária elevada densidade ^{m5} CpG	
		CAP (Afinidade com CXXC*)	Imunoprecipitação de DNA que contém CpG não-metilados (uso de coluna domínio-CXXC).		Método directo para extrair DNA não metilado.	Necessária elevada densidade CpG	
Histonas	ChIP Imunoprecipitação da cromatina		A cromatina modificada é purificada pela imunoprecipitação de “cromatina <i>crosslinked</i> ” (uso de anticorpo específico) para cada tipo de modificação de histonas.				DNA microarrrys (ChIP-chip) SAGE (ChIP-SAGE) ChIP-seq

* X – qualquer resíduo. HELP – *HpaII* tiny enrichment by ligation-mediated PCR; MBD – methyl-binding domain; RLGS – restriction landmark genome scanning; *MSP – methylation Specific PCR - primers são desenhados para amplificar apenas reigões metiladas; MSP-TaqMan – MSP baseado na tecnologia PCR em tempo real (“MethylLight”) – sonda fluorescente, que apenas se liga a DNA metilado, é usada para detectar padrões de metilação; ChIP-chip – DNA é purificado e amplificado, seguido de marcação com sonda fluorescente e posterior hibridação com array.

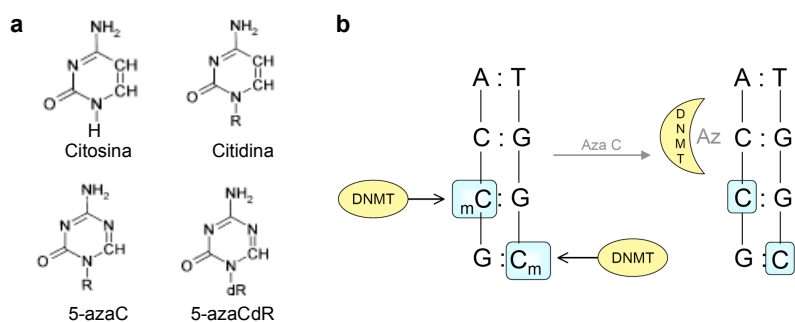
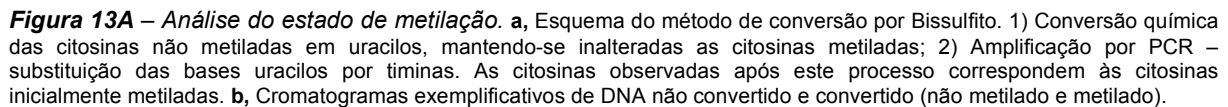
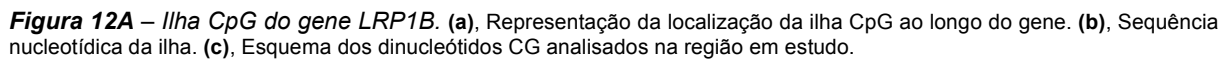


Figura 11A – Mecanismos de inibição de *DNMT1* pela 5-Aza. **a**, Estruturas de citosina, citidina, 5-Azacidina e análogo desoxi (adaptado de ⁶¹) **b**, Mecanismo de actuação de 5-AzaC (adaptado de ⁴²). (R - ribose; dR – desoxirribose)

Tabela 3A – Inibidores de *DNMTs* e *HDACs* em uso em ensaios terapêuticos (adaptado de ^{39,48}).

Composto	Categoria funcional	Nome comercial	Ensaio Clínicos	Tipo de cancro
5-Azacidina 5-Aza-CR	DNMT	Vidaza	I, II, III; FDA aprovou para SMD	SMD; Tumores hematológicos
5-Aza-2'-desoxicitidina 5-Aza-CdR; Decitabine	DNMT	Dacogen	I, II, III	SMD; Tumores hematológicos
Zebularine 1-β-D-ribofuranosil-2(1H)- pirimidinona	DNMT	-	Pré-clínico	-
PBA (4-fenilbutirato)	HDAC	-	I	Tumores sólidos refractários
SAHA (<i>Suberoylanilide hydroxamic acid</i>)	HDAC	Vorinostat	I, II	Tumores sólidos e hematológicos
NVP-LAQ824	HDAC	-	I	-
Depsipeptide; FR901228 Romidepsine; FK-228;	HDAC	-	I, II	Neoplasias avançadas, CLL, AML, e linfomas de células T
MS-275	HDAC	-	I, II	Tumores sólidos e linfomas
MGCD0103	HDAC	-	I, II	Tumores sólidos e hematológicos
LBH589	HDAC	-	I (+Sorafenib)	Carcinoma Hepatocelular
SB939	HDAC	-	I	Tumores sólidos e hematológicos



Primers		Fragmento	Ciclos	Programa de PCR
PCR externo	F	gtaggagaaggttgattggttg	45	94°(5'), [94°(30''), 58°(30''), 72° (30'')], 72° (10'), 15° (∞)
	R	ttcacactcactatctacaaacatc		
PCR interno	F	attttagtgatattgtaaatga	40 (linhas)	94°(5'), [94°(30''), 52°(30''), 72° (45'')], 72° (10'), 15° (∞)
	R	aaaaaatattctccttacct	45	

		Primers F e R	Taq buffer	dNTPs	MgCl ₂	Taq DNA polimerase
PCR externo	100 ng DNA convertido	0,4µM	1 x	400µM	1000µM	2,5 U
Nested PCR	1-2µL produto PCR externo	0,6µM	1 x	800µM	2000µM	2,5 U